

生物化学实验指导

北京大学生物学系
生物化学教研室编

人民教育出版社



50.173057
171(-2)

生物化学实验指导

(修订本)

北京大学生物系
生物化学教研室编

人民教育出版社

中科院植物所图书馆



S0017398

本书自 1958 年出版以来，編者通过几年来的教学实践，又加以修改与补充。实验由 42 个增加到 60 个，并增加了参考书目、注解、附录，内容比教学大纲所规定的要多一些，便于读者在使用时有所选择。本书可供高等院校生物系各专业及有关科学工作人员参考。

参加本书编写工作的是北京大学生物学系生物化学教研室陈同度、郑昌学、王重庆、朱孔生等。

生物化学实验指导

(修订本)

北京大学生物学系生物化学教研室编

北京市书刊出版业营业登记证字第 2 号

人民教育出版社出版(北京景山东街)

人民教育印刷厂印装

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

统一书号 13010·523 开本 850×1168 1/32 印张 5 1/4

字数 117,000 印数 3,001—13,200 定价(5) 元 0.50

1958 年 12 月第 1 版 1964 年 12 月第 2 版 1964 年 12 月北京第 4 次印刷

目 录

再版序	v
第一章 糖的化学		1
实验一	糖的颜色反应.....	1
实验二	糖的还原作用.....	6
实验三	糖脎的形成.....	10
实验四	血糖的定量测定.....	13
第二章 脂肪的化学		19
实验五	中性脂肪的组成.....	19
实验六	卵黄中卵磷脂的提取和鉴定.....	21
实验七	脑中磷脂的分离和鉴定.....	22
实验八	胆固醇的提取和鉴定.....	24
实验九	粗脂肪的定量测定.....	25
实验十	碘值的测定.....	27
第三章 蛋白质的化学		31
实验十一	蛋白质与个别氨基酸的呈色反应.....	32
实验十二	蛋白质的可逆沉淀.....	42
实验十三	蛋白质的不可逆沉淀.....	44
实验十四	蛋白质等电点的测定.....	48
实验十五	Sörensen 氏甲醛滴定法.....	50
实验十六	总氮量的测定.....	53
实验十七	双缩脲比色法测定蛋白质.....	56
实验十八	肝臟核蛋白的分离提取和核酸成分的鉴定.....	58
实验十九	脾臟脱氧核糖核蛋白的提取和鉴定.....	60
实验二十	酵母核糖核蛋白的水解及核糖核酸成分的鉴定.....	61

实验二十一	用定磷法测定组织中的RNA和DNA.....	63
第四章 维生素、激素及植物次生物		69
实验二十二	维生A的定性試驗.....	69
实验二十三	维生D的苯胺試驗.....	71
实验二十四	维生B ₁ 的顏色反應.....	71
实验二十五	维生B ₂ 的定性試驗.....	73
实验二十六	尼克酸的定性試驗.....	74
实验二十七	维生B ₆ 的鉴定.....	76
实验二十八	维生C的定量測定.....	76
实验二十九	肾上腺素的提取和鉴定.....	79
实验三十	肾上腺素对血糖含量的影响.....	80
实验三十一	胰島素对血糖含量的影响.....	81
实验三十二	鞣质的定性反应.....	82
实验三十三	茶碱的提取和一些性质.....	83
第五章 酶		87
实验三十四	酶的特异性.....	87
实验三十五	唾液淀粉酶的激动和抑制.....	89
实验三十六	溫度对酶活性的影响.....	90

实验三十七	pH 对酶活性的影响.....	91	实验五十二	氨基移换反应(二).....	113
实验三十八	脂肪酶的定性试验.....	93	实验五十三	氨基酸的生酮作用.....	117
实验三十九	氧化酶的定性反应.....	94	第七章 血液定量分析..... 119		
实验四十	细胞色素和细胞色素氧化酶的定性反应.....	96	实验五十四	血清钾的测定.....	119
实验四十一	琥珀酸脱氢酶活性的测定.....	97	实验五十五	血清钙的测定.....	120
实验四十二	过氧化物酶的定性反应.....	98	实验五十六	血中无机磷的测定.....	121
实验四十三	过氧化氢酶的定性反应.....	99	实验五十七	血中胆固醇的测定.....	123
实验四十四	黄酶的定性试验.....	100	第八章 尿的分析..... 125		
实验四十五	碳酸酐酶的定性试验.....	101	实验五十八	尿酸的测定.....	125
实验四十六	蛋白酶活性的测定.....	102	实验五十九	尿素的测定.....	126
第六章 组织代谢..... 104			实验六十	尿中病理成分的检查.....	127
实验四十七	组织的自溶.....	104	附录 129		
实验四十八	糖元酵解作用.....	105	实验室规则.....		129
实验四十九	发酵过程中无机磷的利用.....	107	实验室基本操作和实验室常识.....		131
实验五十	脂肪酸的氧化.....	108	容量仪器使用法.....		133
实验五十一	氨基移换反应(一).....	110	分析天平的使用和保护.....		134
			离心机的使用.....		135
			光电比色计原理和使用.....		136
			试剂的配制.....		140
			缓冲溶液及其配制.....		149
			计算公式.....		152
			一些常用数据表.....		156

2363

再 版 序

这本生物化学实验指导原由陈同度教授担任主编，朱圣賡、徐长法两同志参加编写工作。自从1958年编就出版以来，在高等院校内开始学习和贯彻党的教育为无产阶级的政治服务、教育与生产劳动相结合的方针，以及执行学校工作中以教学为主的規定，关心学生的全面发展，加强学生的基础理论、基本知識和基本技能的教学，加强实验課，贯彻勤儉办学的精神等等。在北京大学生物学系里，生物化学实验課的教学內容和教学方法都曾經经历过多次革新的尝试，这些尝试体现了我們在贯彻党的教育方针方面的努力。当然，我們在生物化学教学过程中，学习和贯彻党的教育方针还只是一个开端，我們还需要继续不断的努力。

这里还必須說明，在这次修訂生物化学实验指导的过程中，曾經得到許多兄弟院校的支持。他們在試用本书(初版)的过程中提供了許多宝贵意見；一些兄弟院校的教师又来到北京大学，和我們在一起，参加生物化学实验課的教学工作和革新工作。在此，謹向他們表示謝意。

至于这次修訂，在內容上，比教学大綱要求的要多一些。这样做，便于不同院校在使用这本书时有选择的余地，也便于因才施教，使有条件的学生可以多做一些实验。实验的內容增加了血液定量分析四个实验、尿的分析三个实验、脑中磷脂的分离和鉴定、肝臟核蛋白的分离提取和核酸成分的鉴定、用光电比色法測定谷丙轉氨酶和氨基酸、維生素、酶的一些定性实验。另外，我們还增加了参考书目和注解。还有許多实验，在操作上或文字上作了修改。在附录中增加了实验基本操作和实验室常識、光电比色計原理和

使用、緩衝溶液的配制和一些常用数据表。把原来分散在定量实验中的一些计算公式汇集在一起，编入附录作为参考。不鼓励同学们直接使用这些计算公式。

这次修訂稿，仍由陈同度教授担任主编，并由郑昌学、王重庆、朱孔生等同志参加编写工作，范鎮基同志参加积累資料的工作，华惠芬同志参加实验工作。此外，北京大学1960級生物化学专业的部分同学在假期中曾为修訂的一些实验进行試做。向志恒同志抄写了大部分修訂稿。

我們誠摯地欢迎使用本书的教师、实验員、同学和讀者对本书提出批評和指正。

北京大学生物学系生物化学教研室

1964年3月27日

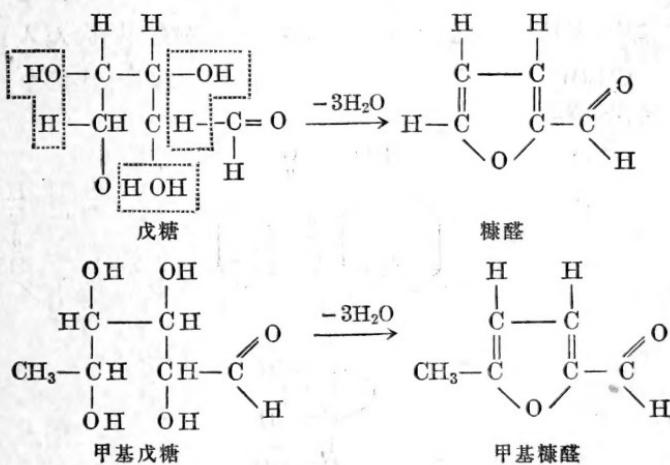
第一章 糖的化学

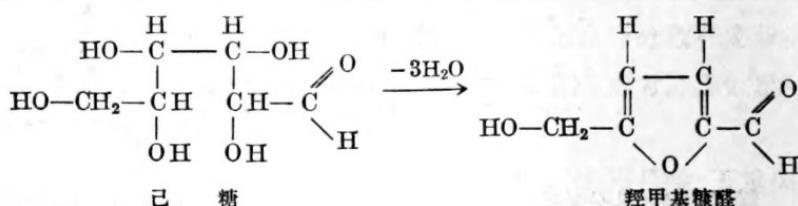
糖为生物界分布最广的有机化合物，为生命活动能的主要来源。在植物组织中，其含量可达干重的80%，在动物及人体组织中含量较少，约占干重的2%。

糖亦称碳水化合物。按其化学构造，糖是多羟醇的醛或酮及其衍生物。葡萄糖为一种醛糖，果糖为一种酮糖。通常根据分子中的单糖数目把糖分成三大类：(1)单糖，如葡萄糖、果糖和阿拉伯糖；(2)二糖、三糖和四糖等低聚糖，如乳糖、麦芽糖、蔗糖和棉子糖；(3)多聚糖(多糖)，如淀粉、糖元和纤维素等。

实验一 糖的颜色反应

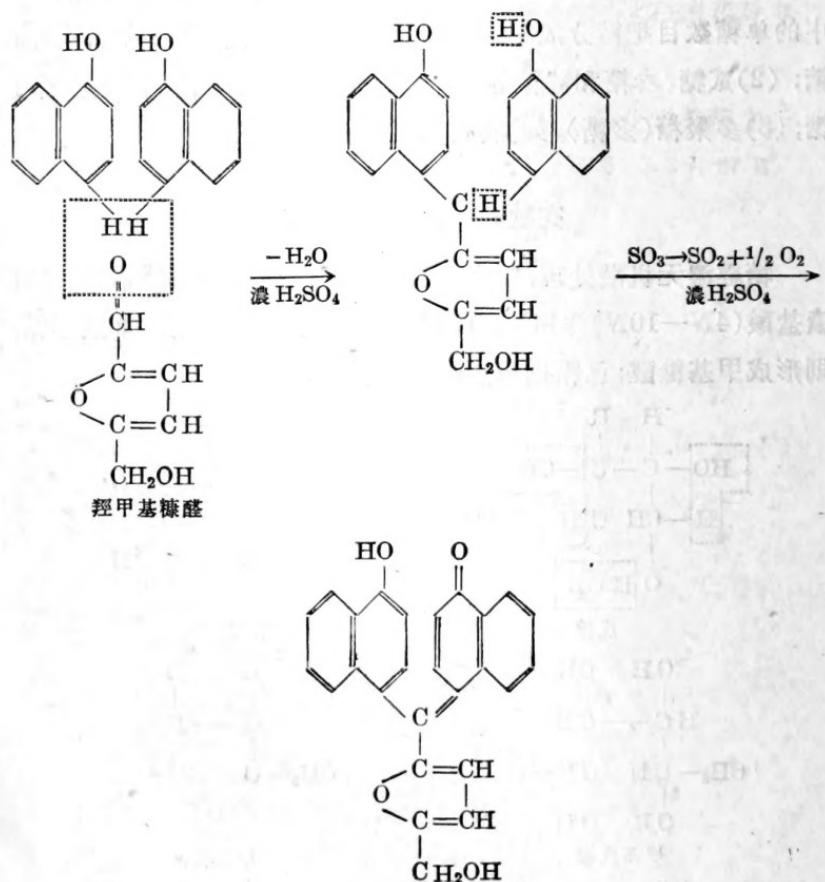
糖经浓无机酸处理，脱水产生糠醛(呋喃醛)或糠醛衍生物。在浓盐酸(4N—10N)作用下，戊糖形成糠醛；甲基戊糖，如鼠李糖，则形成甲基糠醛；己糖则形成羟甲基糠醛。

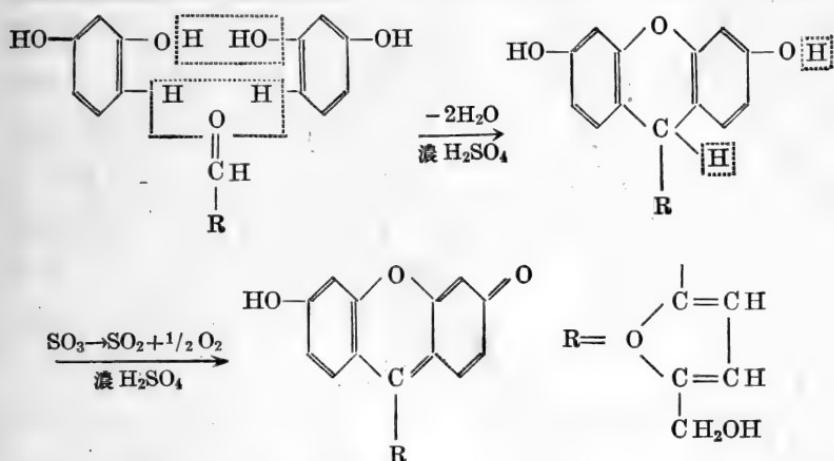




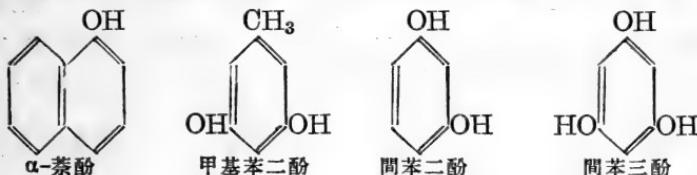
这些糠醛和糠醛衍生物在浓无机酸作用下，能与酚类化合物缩合生成有色物质。

与一元酚如 α -萘酚作用，形成三芳香环甲基有色物质。与多元酚如间苯二酚作用，则形成氧杂蒽有色物质

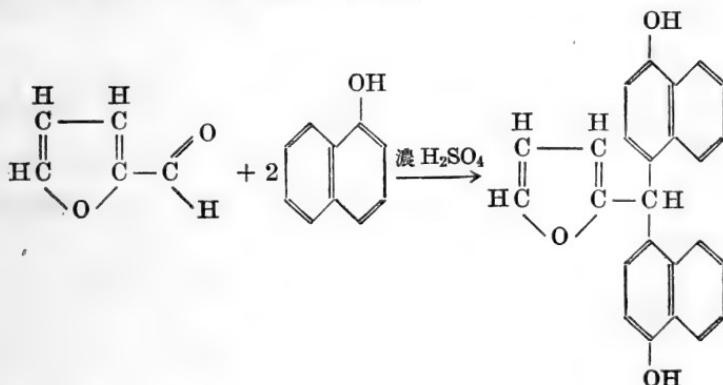


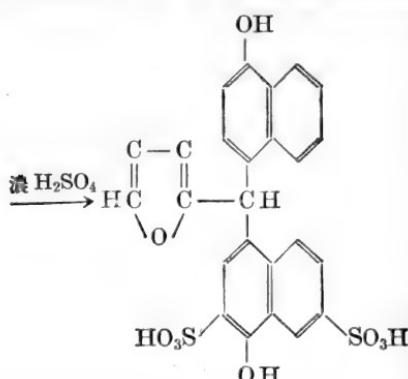


通常使用的无机酸为硫酸。如用盐酸，则必须加热。常用的酚类为 α -萘酚、甲基苯二酚、间苯二酚和间苯三酚等，有时也用芳香胺、胆酸、某些吲哚衍生物和一些嘧啶类化合物等。



有人认为，用浓硫酸作脱水剂时，酚核的磺化也是形成颜色产物的一个因素，因此提出如下反应式。





器材 (1)試管及試管架; (2)水浴鍋。

試劑 (1) 2% 葡萄糖溶液; (2) 2% 果糖溶液; (3) 2% 半乳糖溶液; (4) 2% 阿拉伯糖溶液; (5) 2% 麦芽糖溶液; (6) 2% 蔗糖溶液; (7) 1% 淀粉溶液; (8)濃硫酸; (9) Molisch 氏試劑^[1]^①; (10) Seliwanoff 氏試劑^[2]; (11) Tollen 氏試劑^[3]; (12) Bial 氏試劑^[4]。

(1) Molisch 氏反应 (α -萘酚試驗): 本試驗為 Molisch 氏在 1886 年发现^(1,2)^②。它是鑑定糖类最常使用的顏色反應^③。自由存在的糖和以結合形式存在的糖，均呈阳性反应。氨基糖不呈阳性反应。此外，丙酮、甲酸、乳酸、草酸、葡萄糖醛酸、各种糠醛衍生物和甘油醛等呈顏色近似的阳性反应。因此，阴性反应为无糖类物质存在之确证，而阳性反应，则只指出有糖存在之可能。反应形成的有色物质溶于乙醇。

取 5 支試管，标号后，分別加入 2% 葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖和 1% 淀粉等溶液各 1 毫升。再各加 Molisch 氏試劑 2 滴，混匀。将試管傾斜，沿管壁徐徐注入濃硫酸約 1 毫升。硫酸应与

① 这里的“[1]”表示书末附录中“試劑的配制”的序号，其余依此类推。

② 这里的“(1,2)”表示本章末所附的参考书目的序号，其余依此类推。

③ 本試驗非常灵敏，0.001% 葡萄糖和 0.0001% 蔗糖溶液即能呈现阳性反应。因此，不可使滤紙毛或碎屑混入样品中。

糖溶液很清楚地分成兩層。隨時觀察兩液面間的紫色環出現^①。數分鐘內如無顏色變化，可在水浴中溫熱後再行觀察。記錄各管顏色出現的先後次序。

(2) Seliwanoff 氏反應(間苯二酚-鹽酸試驗)：本實驗為 Seliwanoff 氏在 1887 年發現的⁽³⁾。它是酮糖的特異反應^②。在酸的作用下，酮糖極易形成羥甲基糠醛，所以反應迅速。在同樣情形下，醛糖形成羥甲基糠醛較慢，只當濃度較高時，或煮沸時間較長時，才給出微弱的紅色陽性反應^③。蔗糖和含有酮糖基的多糖，在酸的作用下水解生成酮糖亦能給出陽性反應^④。戊糖亦呈 Seliwanoff 氏反應，生成綠色到藍色產物。在這裡和間苯二酚縮合的物質是糠醛，不是羥甲基糠醛。

取試管 4 支，各加入 Seliwanoff 氏試劑 1 毫升，再分別加入 2% 果糖、蔗糖、葡萄糖和阿拉伯糖溶液各 4 滴。混勻後，置沸水浴內。1—2 分鐘內觀察並記錄顏色變化。20 分鐘後，再進行觀察，記錄顏色和有無沉淀。

(3) Tollen 氏反應(間苯三酚反應)：此反應是 Tollen 氏在 1896 年發現的⁽⁴⁾。它是戊糖、半乳糖和糖醛酸的特異反應。但採用這一方法時要十分小心，特別是加熱時間的長短。糖和酸以及試劑的濃度，也應該很好地加以控制，控制試劑的濃度特別重要。在

① 用果糖作實驗時，如溶液過濃，由於硫酸對它的焦化作用，將出現紅色及褐色而不呈紫色。改用較稀的糖溶液重做。

② 本反應常被認為是果糖的特異反應。事實上，山梨糖、丙酮糖、丁酮糖、甲醛果糖(福模糖)等酮糖，都呈陽性反應。

③ 果糖的陽性反應十分迅速，在煮沸 20—30 秒後即出現鮮紅色，而葡萄糖所需時間較長，且只產生黃色到淡紅色。

④ 蔗糖在酸作用下極易水解生成果糖和葡萄糖，在 1—2 分鐘後即呈陽性反應。因此，酸濃度不能過高，一般使用 12% HCl 溶液。近來，有人用低濃度的 HCl 溶液或硫酸的醇溶液或改用較弱的有機酸如醋酸等來代替 12% HCl。

一定条件下，戊糖、半乳糖和糠醛都呈正反应。但戊糖反应最快，所形成的朱红色沉淀溶于酒精和戊醇中，此溶液在D带和E带间有特异的吸收光带。阿拉伯糖先呈紫红色，逐渐变成深红色，煮得越久，颜色越深，并出现沉淀。半乳糖也呈类似的颜色反应，但其产物的醇溶液在D带和E带间无吸收光带，以此区别戊糖和半乳糖。果糖也产生反应，但先呈橘黄色，后呈棕色，糠醛也能产生与戊糖相同的结果。

取试管3支，各加入Tollen氏试剂1毫升，再分别加入2%阿拉伯糖、果糖及半乳糖溶液各1滴。将各试管放入沸水浴内煮2分钟，观察颜色变化。要注意观察阿拉伯糖紫红色的迅速出现。

(4) Bial氏反应(甲基间苯二酚反应)^①：此反应之特异性与间苯三酚反应相同。戊糖和糠醛在浓无机酸的作用下都与甲基间苯二酚发生反应，产生深蓝色的沉淀物。此沉淀物溶于正丁醇。在1907年Bial⁽⁵⁾观察到，加入少量FeCl₃可以增加此反应的灵敏度，因此，含有FeCl₃的甲基间苯二酚试剂称为Bial氏试剂。己糖也能发生反应，但产生灰绿色甚至棕色的沉淀物，而不产生深蓝色的沉淀物。

取2支试管，各加入1毫升Bial氏试剂，再分别加入2滴2%葡萄糖和阿拉伯糖溶液。在沸水浴中加热。阿拉伯糖经绿色而成深蓝色沉淀^②。

实验二 糖的还原作用

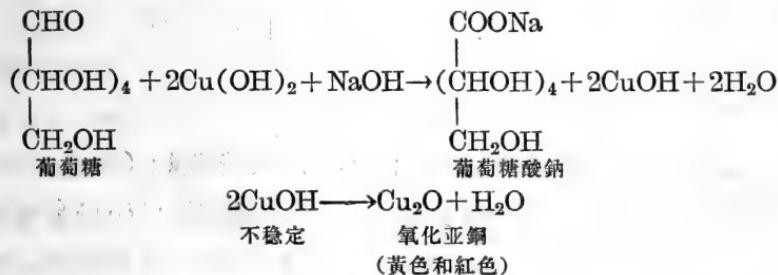
含有自由醛基($-CHO$)或酮基($\text{C}=\text{O}$)^③的单糖和甙糖为

① 此反应原为Tollen氏反应，后经Bial氏修改，所以称Bial氏反应。

② 在测定未知糖时，如果颜色不明显，可以用3倍体积水冲稀反应产物，并加入1毫升戊醇，摇动。如有蓝绿色在醇溶液中出现，即为阳性反应。

③ 酮基本身并没有还原作用，只有在变为烯醇式后，才显示还原性。

还原糖。在碱性溶液中，还原糖能将金属离子（铜、铋、汞、银等）还原，糖本身被氧化成酸类化合物。这种作用在微酸溶液中亦能进行，但速度较慢。硫酸铜与碱溶液混合加热，则生成黑色的氧化铜沉淀。若同时有还原糖存在，则产生黄色或红色的氧化亚铜沉淀。沉淀的颜色决定于 Cu_2O 颗粒的大小， Cu_2O 颗粒的大小又决定于反应的速度。反应快时，生成的 Cu_2O 颗粒较小，呈黄绿色；反应慢时，生成 Cu_2O 颗粒较大，呈红色。实际生成的沉淀含有大小不同的 Cu_2O 颗粒^①。有保护胶体存在时，常常生成黄色沉淀。上述反应可用下列方程式表示：

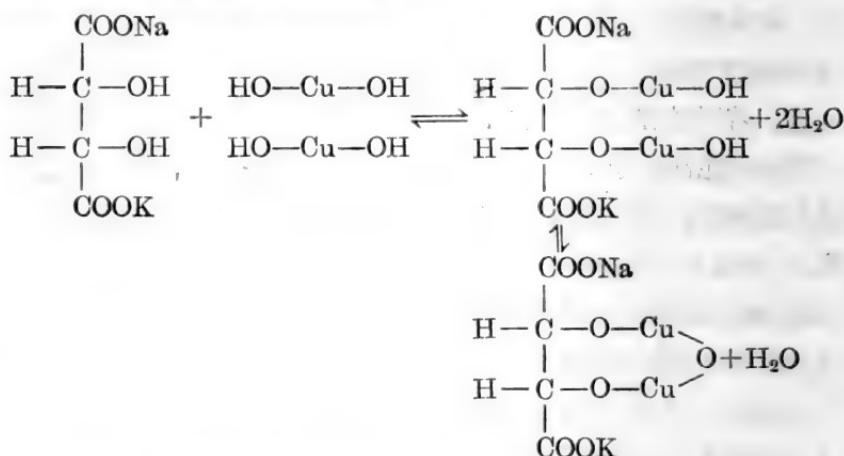


但是糖在碱的作用下，不仅产生烯醇化、异构化等作用，从而促进还原的进行，同时也能发生糖分子的分解、氧化、还原或多聚作用等。由这些作用所形成的复杂混合物具有强烈的还原作用。因此，企图用简单的氧化作用来写出糖的反应平衡式，或用简单的还原作用来写出金属离子的反应平衡式，都不太可能。

为了防止铜离子和碱反应生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀，可在铜试剂中加入适量的柠檬酸盐（Benedict 氏试剂）、酒石酸钾钠（Fehling 氏试剂）、甘油（Haines 氏试剂）或 NH_3 （Purdys 氏试剂）。这些含羟基的有机化合物能与铜离子反应生成可溶性的络离子。反应是可逆的，平衡后，溶液内含有一定浓度的氢氧化铜。

^① 也有人认为生成之沉淀为黄色 CuOH 和红色 Cu_2O 的混合物。

以酒石酸鉀鈉為例，反應式如下：



器材 (1) 試管及試管架；(2) 水浴鍋。

試劑 (1) 2% 葡萄糖溶液；(2) 2% 果糖溶液；(3) 2% 阿拉伯糖溶液；(4) 2% 麦芽糖溶液；(5) 2% 蔗糖溶液；(6) 1% 淀粉溶液；(7) 1% 硫酸銅溶液；(8) 10% 氢氧化鈉溶液；(9) Fehling 氏試劑^[5]；試劑 A、試劑 B(臨時等量混合)；(10) Benedict 氏試劑^[6]；(11) Barfoed-Tauber-Kleiner 試劑^[7]；(12) 磷鉬酸試劑^[8]。

(1) Trommer 氏試驗：取試管 4 支，分別加入 2% 葡萄糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖溶液各 1 毫升。再各加 10% 氢氧化鈉溶液 1 毫升，搖勻，滴加 1% 硫酸銅溶液，直至發生輕微混濁為止。放入沸水浴內加熱，觀察有無黃色或紅色沉淀^①。

(2) Fehling 氏反應⁽⁶⁾：Fehling 氏反應是 Trommer 氏反應的

① 反應液加熱過久，則溶液變成棕褐色，且有黑色沉淀。這一方面由於糖在濃鹼的作用下分解成各種產物，使溶液變棕褐色(Moore 氏反應)；另一方面是由於多餘的沒有被絡合的 Cu⁺⁺ 在鹼性溶液中加熱而生成黑色 CuO 沉淀。因為棕褐色和黑色沉淀對實驗干擾，Trommer 試驗已不常被採用。但作為原始的還原反應試驗，以便用來與下述 Fehling 氏和 Benedict 氏反應作對比，還是有意義的。

修改，是还原糖特有的反应^①。在 Fehling 氏試剂中，除了 NaOH 和 CuSO₄ 以外，还有酒石酸鉀鈉作为 Cu⁺⁺ 的絡合剂。

取 5 支試管，各加入 Fehling 氏試剂 A 和 Fehling 氏試剂 B 各 1 毫升。混匀后，分別加入 2% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖和 1% 淀粉溶液各 4 滴^②。放入沸水浴內煮 2—3 分钟后，冷却。注意沉淀和顏色的变化^③。

(3) Benedict 氏反应^(7,8)：Benedict 氏試剂是 Fehling 氏試剂的改良。它利用檸檬酸作为 Cu⁺⁺ 的絡合剂，同时其碱性比 Fehling 氏試剂弱。因此，它在实际应用中有更大的优点^④。

于 4 支試管中先各加入 Benedict 氏試剂 2 毫升，再分別加入 2% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖各 4 滴。在沸水浴中煮 2—3 分钟。冷却后，观察变化^⑤。

(4) Barfoed 氏反应⁽⁹⁾：本實驗的特点是还原作用在酸性溶液中进行。在这种情况下，单糖和还原貳糖的还原速度有明显差异，单糖在 3 分钟內就能还原 Cu⁺⁺ 而还原貳糖則需 20 分钟^⑥。

① 溶液中如含有氯仿，热碱可使之分解生成还原性物质，也呈阳性反应。某些本质上不是醛或还原糖的化合物，如苯肼、胲、酰肼、多元酚、二苯羥乙酮等也能使試剂还原。芳香醛与試剂不起作用。铵盐对反应有干扰，如果被檢溶液（如尿）中铵盐过多，应加入 Na₂CO₃ 至碱性，并加热煮沸，使铵盐分解。

② 如果被檢液呈酸性，在試驗前，应中和或碱化。

③ 由于 Benedict 氏反应的灵敏度高和干扰因素少，同时只需要一个溶液，Fehling 反应已在实际应用中为 Benedict 氏反应所代替。

④ 溶液中有 0.01% 葡萄糖就可以檢驗出来。0.2—0.3% 葡萄糖就能迅速形成沉淀。脂肪醛（除甲醛外）也能发生反应。不受氯仿干扰，尿酸盐或肌酸酐等尿中的其他成分的干扰程度也小于 Fehling 氏反应。

⑤ 溶液中还原糖的濃度可以从生成的沉淀多少来估計，而不能从沉淀的顏色来區別。

⑥ 有人曾測过葡萄糖等单糖烯醇化所需的最低 pH 为 4 左右。因此，在弱酸溶液中单糖能进行烯醇化而表現还原性，而还原貳糖則不能。

所以可以用来区别单糖和还原糖。加热时间如过长，非还原性糖亦能水解而呈现还原反应，如蔗糖在 10 分钟内水解而发生反应。还原糖浓度过高时也会很快呈现阳性反应。因此，在分析研究时，必须掌握条件。Barfoed 氏原先是用约 0.15N 醋酸，但易于挥发。Tauber 和 Kleiner 二氏改用乳酸，并利用磷钼酸作为显色剂，使灵敏度进一步提高。改名为 Barfoed-Tauber-Kleiner 反应⁽¹⁰⁾。

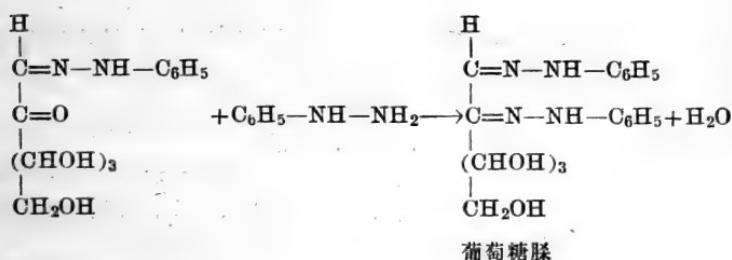
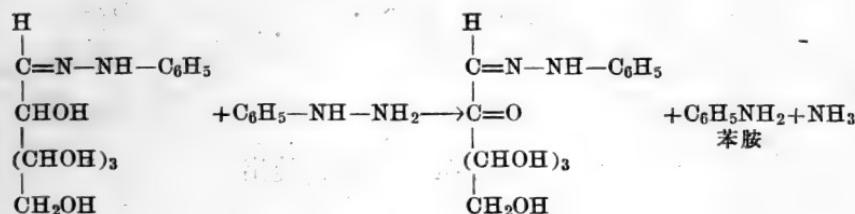
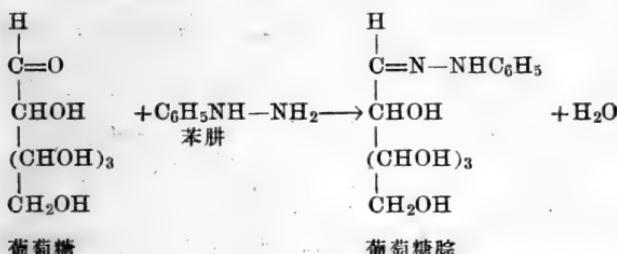
(A) 取 2 支试管，分别加入 2% 葡萄糖、麦芽糖溶液各 3 滴，再各加 Barfoed-Tauber-Kleiner 试剂 1 毫升，在沸水浴中加热 3 分钟。冷却后，观察变化⁽¹⁾。

(B) 取 2 支试管，分别加入 2% 葡萄糖和麦芽糖溶液各 3 滴，再各加 Barfoed-Tauber-Kleiner 试剂 1 毫升，在沸水浴中加热 3 分钟。冷却后，各加 1 毫升磷钼酸显色剂。混合。观察并记录变化。

实验三 糖脎的形成

Fischer 氏⁽¹¹⁾第一个指出，许多糖在稀醋酸溶液中能与苯肼化合生成脎。后来发现这些糖为含有自由醛基或酮基的还原糖。还原糖与苯肼或苯肼衍生物在一定条件下共热，首先形成特异的苯脎(糖脎)。苯脎一般溶于水并且继续进行反应，不易分离。它与另一分子苯肼发生反应，形成脎的氧化产物，而苯肼被还原成苯胺和 NH₃。苯脎氧化产物再与另一分子苯肼发生反应，形成苯脎(糖脎)。

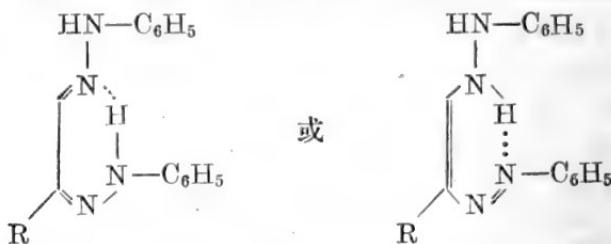
⁽¹⁾ NaCl 干扰 Barfoed 氏反应，因此不能用作尿的试验。在酸性条件下，反应产生的 Cu₂O 沉淀聚集在试管底部，溶液仍为深蓝色。观察结果时，应看试管底部红色的出现，不是像其他一般还原性实验那样，反应液由蓝变绿变黄或变红。



不同还原糖所生成的脎，化学构造不同，晶形、熔点和溶解度亦各不相同^①。因此，成脎反应可用来鉴别各种还原糖。因为第3到第6四个碳原子构形相同，果糖、葡萄糖和甘露糖则均形成葡萄糖脎。

糖脎比较稳定，因为它可以借氢键形成螯形结构。

^① 因为结晶形状可以随结晶条件改变，熔点实际上是分解点，温度间距也较大，成脎反应不是鉴定糖的理想方法。



不同的糖形成糖脎的速度不同。Mulliken⁽¹²⁾曾得出一些糖成脎的速度次序如下：

D-果糖	2分钟
D-葡萄糖	4—5分钟
D-半乳糖	15—19分钟
乳糖	在溶液冷却后沉淀出
麦芽糖	同 上
蔗糖	30分钟内无反应

事实上，实验条件不同时，反应速度也不同，但快慢次序不变。
有关成脎反应的理论，可参阅参考书目⁽¹³⁾。

表1. 豪的晶形和熔点

名 称	半乳糖脎	葡萄糖脎	麦芽糖脎	乳糖脎	阿 拉 伯 糖 豪
結 晶 形	长薄片状	黄色細針狀	长薄片状	細針狀	长細和各种曲線狀
熔 点	214°C	204—205°C	205—206°C	200°C	167°C

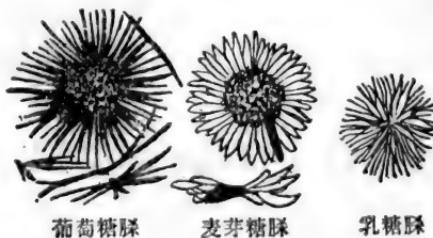


图1. 豪的晶形。

器材 (1)試管及試管架; (2)水浴鍋。

試劑 (1)盐酸苯肼-醋酸鈉混合物 (比例 2:3)^①; (2) 2% 葡萄糖溶液; (3) 2% 麦芽糖溶液; (4) 2% 乳糖溶液; (5) 2% 蔗糖溶液。

操作 取試管 4 支, 分別加入 2% 葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖溶液各 2 毫升。再各加入新配制的盐酸苯肼-醋酸鈉混合物約 0.5 克。混匀, 置沸水浴中 (一定要煮沸)。随时将出現沉淀的試管取出, 并記錄时间。煮 20 分钟后, 将所有試管取出, 在室溫下慢慢冷却^②。注意有无沉淀产生。用小吸管吸出結晶, 放在載片上。用蓋片盖好后, 在显微鏡下观察并繪出沉淀的結晶形状和大小。

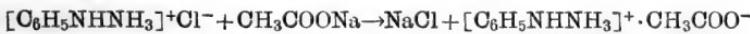
实验四 血糖的定量测定

Hagedorn-Jensen 二氏定糖法

正常人空腹血样的血糖含量約为 80—120 毫克%。糖代謝紊乱, 如患糖尿病时, 血糖含量有显著变化。測定血糖, 对診斷糖代謝紊乱状况, 有临床价值。

血糖的測定, 多是根据糖在热碱性溶液中对某些高价离子的还原作用。最常用的有两价金屬銅离子 Cu^{++} 和高铁氰离子 $Fe(CN)_6^{4-}$ 。Folin 和吳宪二氏⁽¹⁴⁾用銅作氧化剂, 用比色法測定生成的氧化亚銅, 来計算血糖量。此法又被 Somogyi⁽¹⁵⁾ 及 Nelson⁽¹⁶⁾改进。Hagedorn-Jensen⁽¹⁷⁾ 利用高铁氰离子来氧化血糖, 再用碘滴定法測定剩余的 $Fe(CN)_6^{4-}$, 也可算出血糖量。用 Ha-

① 往往用苯肼的盐酸盐代替苯肼。因此, 反应要在有醋酸鈉的条件下进行。盐酸苯肼与醋酸鈉首先进行置换反应, 形成游离的苯肼。

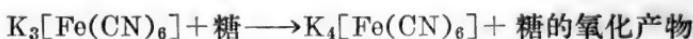


② 最好在温水中保温结晶, 形成的晶体大而清楚。

gedorn-Jensen 定糖法所测得的血糖，不仅包括葡萄糖，还包括血中一些其他还原物质如尿酸、肌酐、谷胱甘肽等^①。但这些还原性物质在血中含量不多，影响不大。

Hagedorn-Jensen 二氏定糖法，是一个微量定糖法。其原理如下。

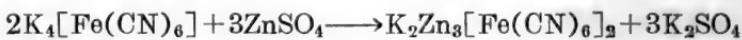
先将被检验血^②与氢氧化锌胶体溶液共热，除去血中蛋白质。滤液与一定量过量的铁氰化钾（红血盐） $K_3[Fe(CN)_6]$ 共热，使部分的铁氰化钾被还原为亚铁氰化钾（黄血盐， $K_4[Fe(CN)_6]$ ）。



剩余的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 可用碘滴定法测定。



这一反应是可逆的。为了使此反应进行完全，除加入醋酸酸化外，并加入硫酸锌来沉淀 $Fe(CN)_6^{4-}$ 离子。硫酸锌与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应生成不溶性的复盐。



试剂中的氯化钠可使生成的 $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ 胶体复盐更易沉淀出来。

反应中生成的游离碘，用硫代硫酸钠滴定。在一定实验条件下，还原糖与被还原的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 具有一定数量关系。

还原糖多，剩余的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 就少，产生的游离碘也就少，滴定碘的硫代硫酸钠用量也少。由此可见，糖量和硫代硫酸钠用量成相反关系。但这种关系并不是精确的反比关系。这可能是因为还原糖与铁氰化钾的反应程度受这两种物质相对浓度的影

^① 这些还原物质的还原作用相当于 20—30 毫克葡萄糖/100 毫升血液。

^② 一般由饥饿 24 小时的动物身上取血。用全血测定血糖。为防止血凝和血糖因酶解而损失，可加入氯化钠及草酸钾的混合物(1:3)。每 5 毫升血加此混合物 20 毫克。经此处理的血样，在 2—3 天内，血糖无变化。

响。硫代硫酸鈉用量和还原糖数量的相反关系是由經驗确定下来的(可由表中查得)。因此,本实验要求严格地执行操作規程,如反应的溫度,加热时间的长短等。

器材 (1)試管及試管架; (2)0.1毫升微量吸量管2支; (3)水浴鍋; (4)金屬架(放試管及錐形瓶用); (5)小玻璃漏斗4个; (6)50毫升錐形瓶4个; (7)1、2、3和5毫升吸量管各1支; (8)2毫升微量滴定管; (9)脫脂棉花。

試劑 (1)0.45% 硫酸鋅溶液; (2)0.1N 氢氧化鈉溶液; (3)血液^[10]; (4)0.005N 标准铁氯化鉀碱性溶液^[11]; (5)氯化物-硫酸鋅-碘化鉀溶液^[12]; (6)3% 醋酸溶液; (7)1% 淀粉溶液(溶于飽和NaCl溶液中); (8)0.005N 标准硫代硫酸鈉溶液^[13]。

操作 取4支試管,記上1、2、3、4四个号碼,各加入0.45%硫酸鋅溶液5毫升及0.1N 氢氧化鈉溶液1毫升,混匀。这样制备的氢氧化鋅胶体溶液,可沉淀除去血液中的蛋白质^①。

向1、2号两試管內,用微量吸量管各量入血液0.1毫升。仔細地反复吸入并放出氢氧化鋅胶体溶液3—4次,以洗淨吸量管中殘存的血液。第3、4号两試管为空白对照,不加血液。将上述4支試管一起放入沸水浴中加热4分钟(准确!)。此时,蛋白质呈褐色絮状物上浮,溶液变得透明^②。冷却后,通过塞有已湿润过的小棉花球的小漏斗^③,将試管內容物分別滤入标有1、2、3、4号碼的4个50毫升錐形瓶內。用蒸餾水冲洗残渣2次,每次用3毫升。将洗液通过棉花球滤入錐形瓶內,与滤液合併。

① 氢氧化鋅胶体制成后,应尽快地加入血液样品。否则,加热后,溶液不透明。

② 若溶液不透明(黄褐色),滤液也不透明,最后测得的血糖偏高,有时会高出很多。

③ 取約20毫克的棉花作成棉花球較合适,棉花用量多,会吸附一些糖。棉花球不宜过紧,也不宜过松。

用微量滴定管,准确地在每个锥形瓶内,加入标准铁氯化钾碱性溶液2毫升。

将4个锥形瓶同时放入沸水浴中煮15分钟(必须准确)。取出锥形瓶,立刻在水龙头下冷却。向每个锥形瓶中添加氯化物-硫酸锌-碘化钾溶液3毫升和3%醋酸2毫升,混匀。

将锥形瓶放在白瓷板上,由微量滴定管用0.005N硫代硫酸钠溶液滴定。俟瓶内黄色变得很浅后(不要过了终点),加1%淀粉溶液2滴,继续滴定至瓶内蓝色恰恰消失为止(滴定终点)。

计算 根据血糖换算表,将样品滴定值和空白对照滴定值折合成糖值。两糖值相减,即得100毫升血液中所含葡萄糖毫克数。

表2. Hagedorn-Jensen 二氏血糖换算表

0.005N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 用量(毫升)和血液中葡萄糖含量(毫克/100毫升)
的换算关系

硫代硫酸 钠毫升数	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0.1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0.2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0.3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0.4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0.5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0.6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0.7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0.8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0.9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1.0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161

1.1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1.2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1.3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1.4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1.5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1.6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1.7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1.8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1.9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

参考书目

- (1) Molisch, H., Monatsh., 7, 198(1886).
- (2) Bredereck, H., Ber., 64, 2856(1931); 65, 1110(1932).
- (3) Seliwanoff, T. H., Ber., 20, 181(1887).
- Martin, R. W., H.Z. für physiol. Chem., 259, 62(1939).
- (4) Tollen, S. B., Ber., 29, 1202(1896).
- (5) Bial, M., Biochem. Zeit., 3, 323(1907).
- (6) Fehling, H., Annalen der Chemie, 72, 106(1849).
- (7) Benedict, S. R., J. Biol. Chem., 3, 101(1907).
- (8) Benedict, S. R., J. Biol. Chem., 5, 485(1908—09).
- (9) Barfoed, C., Z. Anal. Chem., 12, 27(1873).
- (10) Tauber, H. and Kleiner, I. S., J. Biol. Chem., 99, 249(1932).
- (11) Fischer, E., Ber., 17, 579(1884); 20, 821(1887).
- (12) Mulliken, S. P., The Identification of Pure Organic Compounds, Vol. I, p. 29, John Wiley and Sons, New York, 1st Ed. (1914).
- (13) Percival, E. G. V., Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. II, p. 23(1948).
- (14) Folin, O. and Wu, H. (吳宪), J. Biol. Chem., 41, 367(1920).
- (15) Somogyi, M., J. Biol. Chem., 117, 771(1937); 160, 161(1945).

- (16) Nelson, N., J. Biol. Chem., 153, 375(1944).
- (17) Hagedorn, H. C. und Jensen, B. N., Biochem. Z., 135, 46 (1923).

第二章 脂肪的化学

在人类、动物和植物組織的基本組成成分中，除了蛋白质和糖之外，尚有脂肪和类脂质。脂肪是高級脂肪酸的甘油三酯，类脂质是在化学或物理性质上类似脂肪的物质。

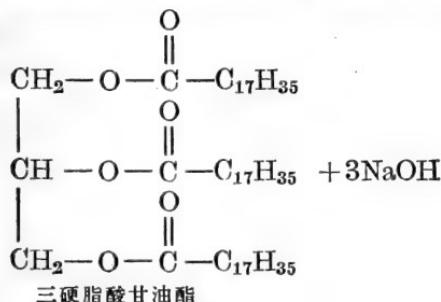
脂肪及类脂质总称为脂肪类化合物。脂肪类化合物一般都溶于脂肪溶剂，如乙醚、石油醚、二硫化碳、氯仿和苯等，但不溶于水或微溶于水。

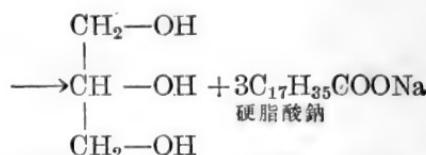
根据化学成分，脂肪类化合物可分为三类：(1)真脂(或中性脂肪)如油和脂；(2)类脂质如磷脂、固醇酯和蜡等；(3)衍生脂肪——脂肪类化合物的水解产物，包括脂肪酸、脂肪族之高分子醇及固醇。

脂肪类化合物在机体中具有重要意义。真脂的卡价高，为生物体的儲能物质，所以又称为儲藏脂肪。类脂质是构成生物細胞物质的重要成分，因此又称結構脂肪。神經系統、性腺、精子和腎上腺皮質等組織中类脂质的含量丰富。

實驗五 中性脂肪的組成

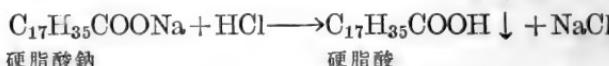
油和脂也叫做真脂，都是中性脂肪，是高級脂肪酸与甘油构成



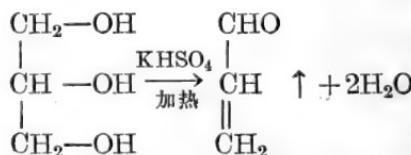


的甘油酯。在酸、碱或酯酶催化作用下，易被水解。用氢氧化钠或氢氧化钾作水解催化剂时，水解产物为能溶于水的脂肪酸钠盐或钾盐(即肥皂)和甘油。这种水解过程称为皂化作用。

用无机酸酸化皂化液，则难溶于水的高级脂肪酸分离析出。



甘油与脱水剂(如 KHSO_4 、 P_2O_5 、 CaCl_2 或无水 Na_2SO_4)共热，或单独热至 450°C 以上时，则脱水生成丙烯醛。丙烯醛有刺激性和特臭，可供辨别。丙烯醛还可以还原银离子成金属银⁽¹⁾。



器材 (1) 試管及試管架；(2)100毫升錐形瓶；(3)10毫升量筒；(4)水浴鍋；(5)玻璃漏斗。

試剂 (1)提炼过的猪油；(2)0.5N 氢氧化钠酒精溶液^[14]；(3)10% 盐酸；(4)3N 氢氧化钠溶液；(5)甘油；(6)固体硫酸氢钾；(7)无水酒精；(8)10% 硝酸銀溶液；(9)濃氨水。

操作 (1)皂化：称取猪油約 0.7 克，置于 100 毫升錐形瓶中，加 10 毫升 0.5N 氢氧化钠酒精溶液。瓶口加軟木塞，塞中插有长玻璃管作为迴流冷凝器，置沸水浴中加热 $\frac{1}{2}$ —1 小时。冷却，备用。

(2)脂肪酸的分离：将新得的皂化液在水浴上溫热，徐徐滴加 10% 盐酸酸化，随加随搖，直至淡黃或白色脂肪酸完全析出为止。

冷却后，过滤。保留滤液作鉴定甘油用，用少量蒸馏水洗涤滤纸上的脂肪酸，直至洗涤液对石蕊试纸呈中性反应。从滤纸上取少量脂肪酸溶于95%酒精中，用石蕊试纸证明此酒精溶液的酸性反应。

再取少量脂肪酸置试管中，先加10毫升蒸馏水，再加3N氢氧化钠溶液2—3滴。加热，但勿煮沸。用力摇荡，脂肪酸与碱化合成肥皂。加入盐酸酸化，则脂肪酸再度析出。

(3)甘油的分离与鉴定：取一支试管，加入甘油数滴和固体硫酸氢钾少许，混匀。另外，取一纸条，用含有数滴硝酸银溶液的浓氨水浸湿，挂在试管口上。徐徐向试管加热，注意丙烯醛之特臭并观察在纸条上出现的棕黑色金属银。加热不能过急，否则一部分KHSO₄被甘油还原，产生SO₂气体。SO₂也有特臭，虽与丙烯醛之特臭不同，容易干扰试验。

在水浴上蒸干本实验操作(2)的滤液。加无水酒精5毫升。搅匀后，静置数分钟。滤入试管内，在水浴上浓缩滤液至浆状。按照上法鉴定有无甘油。

实验六 卵黄中卵磷脂的提取和鉴定

机体的各种组织和细胞均含卵磷脂。在卵黄(约含10%)、神经、精液、脑髓、骨髓、肾上腺、肺、心脏、蘑菇和酵母等组织内含量更高。

纯卵磷脂是白色蜡状块，不溶于水，易溶于醇、氯仿、乙醚和二硫化碳中，但不溶于丙酮。利用后一性质可与中性脂肪分离。

器材 (1)小烧杯；(2)玻璃棒；(3)水浴锅；(4)玻璃漏斗；(5)干燥试管及试管架。

试剂 (1)鸡卵黄；(2)95%乙醇；(3)10%氢氧化钠；(4)丙酮。

操作 (1)提取：取鸡卵黃約2克，放入小燒杯內。注入15毫升热的95%乙醇，并同时攪拌。冷后，滤入干燥試管內，如滤液混浊，重滤，直到完全透明。将滤液在水浴上蒸干。

(2)三甲胺試驗：取以上制得的卵磷脂一部分，放入試管中。加10%氫氧化鈉溶液2毫升并在水浴上加热。卵磷脂分解生成胆碱，胆碱在碱的作用下，形成三甲胺。注意三甲胺的魚腥味。

(3)另取一些卵磷脂，溶于1毫升乙醇中，添加丙酮1—2毫升。观察变化。

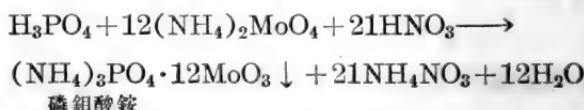
實驗七 腦中磷脂的分离和鑑定

类脂是动植物細胞組織的重要成分。某些植物种子內較多，动物則在脑、肝、心、脾等組織中較多。卵磷脂、腦磷脂、胆固醇均溶于乙醚，神經磷脂不溶于乙醚。卵磷脂、腦磷脂不溶于丙酮，胆固醇則溶于丙酮。卵磷脂溶于乙醇而腦磷脂則不溶。运用这些溶解性质上的差別可将各种类脂分离。磷脂类都是很好的乳化剂。

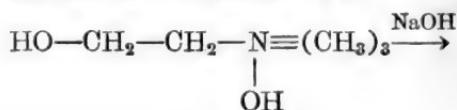
磷脂可被碱水解为脂肪酸盐、甘油、磷酸盐及含氮碱基。这些成分可以用适当方法来分別鑑定。

甘油可以按照實驗五中的方法鑑定。

将类脂质碱水解液酸化，脂肪酸即行析出。磷酸盐在酸性条件下与鉬酸銨作用生成黃色磷鉬酸銨沉淀，反应如下。



在碱性溶液中加热，胆碱分解生成具有魚腥味之三甲胺。三甲胺为碱性物质，能使湿的紅色石蕊試紙变藍。





器材 (1)研鉢; (2)小漏斗; (3)試管; (4)水浴鍋; (5)蒸發皿; (6)離心管; (7)離心机。

試剂 (1)乙醚; (2)丙酮; (3)10% NaOH; (4)濃硝酸; (5)0.1M 鉛酸銨; (6)醋酸酐; (7)濃硫酸; (8)甘油; (9)无水 CaCl_2 ; (10)紅色石蕊試紙。

操作 取1—2克动物脑子, 加少許用水洗过的細砂粒, 用力磨碎后轉入試管中。加5毫升乙醚, 用木塞塞管口, 充分振蕩數分钟。放置10分钟后, 将上层提取液傾入離心管中, 殘渣再用3毫升乙醚提取一次。将两次提取液合併, 溶液如不清亮, 可以離心一次。在50°C水浴中濃縮到0.5毫升。將濃縮液放在冰水浴中, 冷却后, 加入冷的丙酮2毫升, 在冰水浴中放置5分钟使卵磷脂和脑磷脂尽可能完全沉淀出来。離心(1500轉/分約離5分钟)。

將上清液傾入小瓷蒸發皿中并在水浴上蒸干(不能直接用火加热)备用。

向沉淀加少許蒸餾水, 振蕩, 觀察膠狀乳化液的形成(为什么?)。向乳化液中加入4毫升10% NaOH^①。加热至沸, 在管口挂一条湿的紅色石蕊試紙觀察顏色有无变化, 同时不断地注意有无魚腥味。水解15分钟后, 向水解液中加入濃 HNO_3 至明显酸性^②, 有不溶物析出(这是什么物质?)。过滤。取濾液2毫升, 在試管中加入0.5毫升0.1M 鉛酸銨^③。在水浴中加热并觀察結果。將濾渣用少量10% NaOH溶解(不能溶时, 則在水浴上加热), 再加入硝酸酸化, 則脂肪酸再度析出。

向蒸發皿中的殘渣加入2毫升氯仿, 使之溶解, 再加入1.5—2.0

① 不要将碱沾在試管口上, 否則妨碍下一步檢驗三甲胺試驗。

② HNO_3 不能加得过多, 否則影响磷鉛酸銨反應。

③ 鉛酸銨用量不可过多, 最好用新配制的試劑。

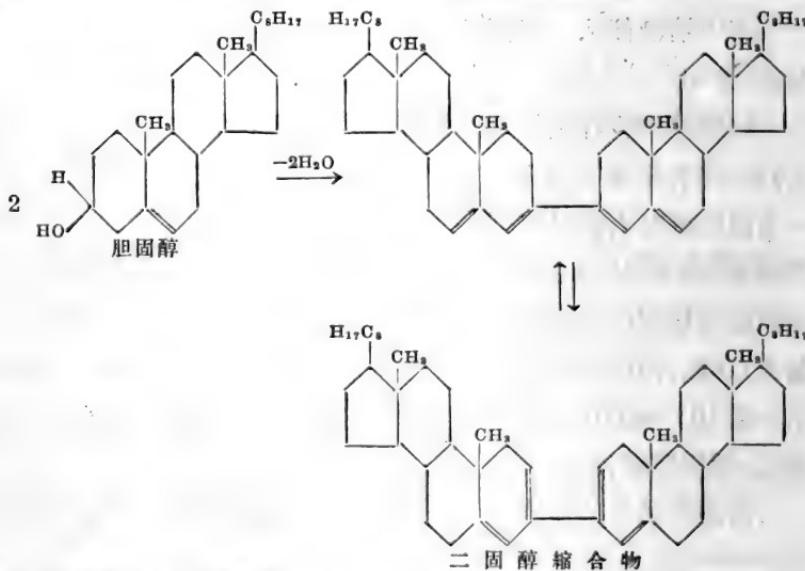
毫升醋酸酐及濃 H_2SO_4 数滴^①，注意顏色变化。参考实验八。

取一干試管加入数滴甘油，再加无水 $CaCl_2$ 約 0.1 克并在火上慢慢加热。待熔化后，注意有无刺鼻气味^②。

实验八 胆固醇的提取和鉴定

人及动物的各种細胞均含有自由存在的和以結合形式存在的胆固醇。脑髓、精液及皮脂內含量較多。胆石內胆固醇含量有时达90%。胆固醇溶于氯仿、石油醚、苯、热酒精及脂肪中。

在无水条件下，胆固醇同乙酸酐和濃硫酸作用呈現藍綠色 (Liebermann-Burchard反应)。此反应先出現紅色，再紫紅色和深綠色。若胆固醇量不多，立即出現綠色。其反应机制可能是胆固醇在濃硫酸作用下先形成实验式为 $C_{58}H_{86}$ 和 $C_{54}H_{88}$ 的二胆固醇縮合物，再与两个或一个硫酸分子結合，生成紅色物质和綠色物



① 濃硫酸用量不能过多，否則會出現淺藍色或棕色。

② 由于磷脂量較少，不能直接用水解滤液做甘油反应，因此改用純甘油进行鉴定。

質。膽固醇也可用 Salkowski 氏反應來鑑定。在此鑑定方法中只用濃硫酸而不用醋酸酐，結果為紅色。其反應機制和 Liebermann-Burchard 反應相似。生成二固醇縮合物的反應見上頁⁽²⁾。

有人利用 Liebermann-Burchard 反應作膽固醇的定量測定。

器材 (1) 干燥試管及試管架；(2) 乳鉢；(3) 玻璃板(10×10 厘米)；(4) 烘箱；(5) 小刀；(6) 木制小鏟；(7) 吸量管。

試劑 (1) 脂髓(猪、兔或白鼠等)；(2) 石膏；(3) 新蒸餾的無水氯仿；(4) 濃硫酸；(5) 醋酸酐。

操作 (1) 提取：注意必須用干燥器材。取脂髓 2—3 克，加 2—3 倍重量的石膏。在乳鉢中仔細搗碎後，用木鏟塗在玻璃板上成一薄層。在 40°C 烘箱中烘干。

用小刀把干片刮到乳鉢內。用杵搗碎後，移入大試管。加氯仿 5—6 毫升，並小心振蕩試管 5—10 分鐘。用氯仿浸濕的濾紙過濾。用濾液做以下呈色反應。

(2) 硫酸試驗(Salkowski 氏反應)：取 2—3 毫升濾液，加約等量的濃硫酸，並謹慎地混合。澄清後，觀察試管內上部(氯仿)出現的紅色和下部出現的帶綠瑩光的黃紅色。

(3) 醋酸酐-硫酸試驗(Liebermann-Burchard 二氏反應)：取 2—3 毫升濾液，加醋酸酐 10 滴及濃硫酸 1—2 滴。逐漸混合。觀察最初產生的紅色漸變為藍色，最後呈藍綠色。若溶液中膽固醇量不多，立即出現綠色。

實驗九 粗脂肪的定量測定

索氏 (Soxhlet) 提取法

本法為重量法，用脂肪溶劑將脂肪提出後稱量之。適用於固體和液体樣品。通常使用的脂肪溶劑為乙醚或沸點為 35 — 45°C 的石油醚。索氏提取器為一循環提取裝置。用本法提取的脂溶性

物质为脂肪类物质混合物，称为“粗脂肪”，其中含有脂肪、游离脂肪酸、磷脂、酯、固醇、芳香油、某些色素及有机酸等。

称取样品的重量视材料中脂肪含量而定。含量在10%以下者，可称取10—12克。含量在50—60%者，则可称取2—4克。

有人用化学反应法、光折射法和比重法等来测定脂肪含量。参考有关评述⁽³⁾。

器材 (1)索氏提取器；(2)水浴锅；(3)烘箱；(4)脱脂棉花；(5)脱脂滤纸；(6)提取纸斗。

试剂 (1)样品(芝麻、花生、大豆或玉米)；(2)无水乙醚。

表3. 几种干的植物种子和种仁中油脂的百分含量

样 品	含 油 量	样 品	含 油 量
向日葵种籽	23.5—45.0	大豆种籽	10.0—25.0
向日葵种仁	40.0—67.8	油桐种仁	47.8—68.9
蓖麻种籽	45.1—58.5	玉米谷粒	3.0—9.0
蓖麻种仁	50.7—72.0	小麦谷粒	1.6—2.6
芝麻种籽	46.2—61.0	稻子谷粒	1.3—2.4
花生种仁	40.2—60.7	豌豆种籽	0.7—1.9

操作 先将样品置100°C烘箱中烘干。冷后，研成粉末^①。准确地称取一定量样品，放入提取纸斗中^②。样品上用脱脂棉塞严。如无提取纸斗，也可用脱脂滤纸包裹样品。将纸斗或纸包放入索氏提取管内(图2)。注意勿使斗内或包内样品高出提取器的虹吸部分。

① 样品的制备十分重要，应先烘去水分。在烘干时要避免过热。样品颗粒不能太大。研磨后，要用脱脂棉擦拭乳钵，并将此脱脂棉放入提取纸斗中一起提取。还可用小量乙醚洗净乳钵，洗后倒入提取管中。

② 样品如为液体，将一定量体积的样品滴在滤纸上。在60—80°C烘箱内烘干后，装入提取器中提取。

于已知重量的索氏提取瓶内，加无水乙醚至半满^①，然后将提取器的各部连接如图。用灯泡或置水浴上用电炉加热（水浴温度约为40—50°C），切勿用火焰直接加热，也不能用火焰烧水浴。乙醚蒸气由联接管上升至冷凝器，凝结成液体，滴入提取管中。到一定水平后，溶有脂肪之乙醚经虹吸管流入提取瓶。调节水浴温度，使乙醚每小时循环10—20次。提取时间视样品性质而定，通常需14—16小时。

提取完毕后，卸下提取瓶^②。在水浴上蒸馏回收乙醚（避免火焰！）。最后置烘箱中（100°C）烤至恒重。计算样品的粗脂肪百分含量。

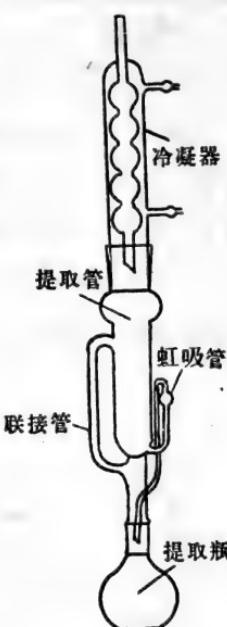


图2. 索氏提取器。

实验十 碘值的测定

脂肪中的不饱和脂肪酸碳链上有不饱和键，可以吸收卤素（Cl₂、Br₂或I₂）。不饱和键数目越多，吸收的卤素量也愈多。每100克脂肪，在一定条件下，所吸收的碘的克数，称为该脂肪之碘值^③。碘值为鉴别油脂的一个重要常数。

① 一般用沸点在60°C以下的有机溶剂提取。虽然经常使用乙醚，但目前倾向于使用石油醚，因为后者对真脂具有更大的选择性提取。乙醚提取的数值一般偏高，有更多的非脂肪物质也被提取。乙醚和石油醚的联合提取已在食品分析中广泛采用，也有人使用乙醚和乙醇的混合液。

② 提取完毕后，再让乙醚蒸到提取管内。在乙醚达到虹吸管高度前，取下提取瓶，这样可以节省下一步操作时间。

③ 碘值是100克脂肪在一定条件下所吸收的碘的克数。无论使用的是溴化碘溶液或氯化碘溶液，最后都以碘的克数来表示碘值。

从碘值可以知道油脂是否为干性油，并可判断氢化时所需氢量；同时可以用来计算脂肪或脂肪酸的定量组成⁽⁴⁾。

由于碘和脂肪的加合作用很慢。氯或溴和脂肪反应虽快，但有取代和氧化等副反应。因此，普通用溴化碘(Hanus 氏溶液)⁽⁵⁾或氯化碘(Wijs 氏溶液)⁽⁶⁾。本实验应用 Hanus 氏溶液^①。溴化碘的一部分与脂肪起加合作用后，测量剩余的一部分。使剩余的溴化碘与碘化钾作用放出碘。放出碘的多少用硫代硫酸钠滴定之。



取样多少决定于油脂样品的碘值。参考表 4 和表 5。

表 4. 样品的最适量和碘值关系

碘 值	样品克数	作用时间 (小时)	碘 值	样品克数	作用时间 (小时)
30 以下	約 1.0	0.5	100—140	0.2—0.3	1.0
30—60	0.5—0.6	0.5	140—160	0.15—0.26	1.0
60—100	0.3—0.4	0.5	160—210	0.13—0.15	1.0

表 5. 几种油脂的碘值

名 称	碘 值	名 称	碘 值
亚麻子油	175—210	花生油	85—100
鱼肝油	154—170	猪油	48—64
棉子油	104—116	牛油	25—41

有关碘值测定法的历史和近况，参阅参考书目^(7,8)。

器材 (1)300 毫升碘值测定瓶(或带玻璃塞的锥形瓶)；(2)10 毫升量筒；(3)50 毫升滴定管；(4)吸量管。

试剂 (1) Hanus 氏溶液^[15]；(2)标准 0.1N 硫代硫酸钠溶

① 用 Hanus 法所得的碘值比 Wijs 法测得的低 2—5%。但 Hanus 试剂比 Wijs 试剂稳定，所以采用较广泛。

液^[16]; (3)純四氯化碳; (4) 1% 淀粉溶液 (溶于飽和氯化鈉溶液中); (5)10% 碘化鉀溶液; (6)花生油或豬油。

操作 准確地稱量約 0.1 克蓖麻油(或約 0.5 克豬油) 2 份。置於兩個乾燥的碘值測定瓶(圖 3)內，切勿使油粘在瓶頸或壁上。加純四氯化碳 5 毫升，輕輕振動，使油溶解。用滴定管仔細地加 Hanus 氏溶液 15 毫升(準確)，勿使溶液接觸瓶頸。塞好玻璃塞，在玻璃塞與瓶口之間加 10% 碘化鉀溶液數滴封閉縫隙，以免碘的揮發損失。在 20—30°C 暗處放置 30 分鐘，並不時輕搖。油吸收的碘量不應超過 Hanus 氏溶液所含之碘量的一半^①。若瓶內混合物之顏色很淺，表示油用量過多。改稱較少量油，重作。

放置 30 分鐘後^②，立刻小心地打開玻璃塞，使塞旁碘化鉀溶液流入瓶內，切勿丟失。用新配制的 10% 碘化鉀 10 毫升和蒸餾水 50 毫升把玻璃塞上的和瓶頸上的液體沖入瓶內，混勻。用 0.1N 硫代硫酸鈉溶液迅速滴定至淺黃色。加入 1% 淀粉約 1 毫升，繼續滴定。將近終點時，用力振蕩^③，使碘由四氯化碳全部進入水溶液內。再滴至藍色消失為止，即達滴定終點^④。

另作 2 份空白對照，除不加油樣品外，其餘操作同上。滴定後，將廢液倒入廢液瓶，以便收回四氯化碳。計算碘值。



图 3. 碘值
測定瓶。

① 鹵素的加合反應是一可逆反應，因此，只有當試劑絕對過量時，才使反應進行較完全。

② 放置時間，一般規定碘值在 110 以下者為 30 分鐘，更高的則放置 1 小時。

③ 用力振蕩是本滴定成敗的關鍵之一，否則容易滴過頭或不足。如果振蕩不夠，四氯化碳層會有紫色或紅色。此時需用力振蕩使碘進入水層。

④ 一些時間後，滴定液應返回藍色，否則就表示滴定過量。

参考书目

- (1) Witzman, E. J., J. Am. Chem. Soc., **36**, 1766(1914).
- (2) Rapoport, S. M. und Raderecht, H. J., Physiologisch-Chemisches Praktikum, p. 124—125, Veß verlag Technik, (1956).
- (3) Progresses in Chemistry of Fats and Other Lipids, Editors: Holman, R. T., Lundberg, W. O. and Malkin, T., Vol. V, p. 4—7 (1958).
- (4) 季諾維耶夫, A. A., 油脂化学, 286 頁.
- (5) Hanus, J., Z. Nahr. Genusmitt., **1**, 913(1901).
- (6) Wijs, J. J., J. Soc. Chem. Ind., **17**, 698(1898).
- (7) 如(3), p. 25.
- (8) Leach, A. E., Food Inspection and Analysis, John Wiley and Sons Inc., New York(1920).

第三章 蛋白质的化学

蛋白质是一切生活細胞和有机体的最重要的和最必需的組成成分。它們构成人体及所有动物机体組織干物质的主要部分，是生命現象的主要承担者。

蛋白质是复杂的高分子化合物，分子量从几万到几百万，溶于水中时成亲水胶体溶液。蛋白质是由 20 余种氨基酸以肽鍵相互联接而成的。在酸、碱和特殊的酶(蛋白酶)作用下，蛋白质水解而成胨、胰、肽，并最后形成氨基酸。

蛋白质分子中既含有羧基，又含有氨基等酸碱基团，因而是酸碱两性化合物。在特定的 pH 条件下，蛋白质酸性基团的解离度与碱性基团的解离度相等，分子成为带有正負电荷相等的中性形式，在电場中不向两极移动。此 pH 值称为該蛋白质的等电点。处于等电点的蛋白质溶液不稳定，蛋白质极易沉淀析出。

蛋白质分子依靠氢鍵、盐鍵等副价鍵維持一定的空間构形。其空間结构易受各种物理化学因素影响，結果氢鍵等副价鍵破裂，它們的物理化学性质和生物学活性也随之改变。此現象称为蛋白质的变性。

許多物理化学因素可以改变蛋白质在水中的溶解度，产生可逆或不可逆沉淀。这些物理化学因素常用来分离、提純和除去蛋白质。

蛋白质按其分子組成可分为两大类：(1)分子完全由氨基酸构成的简单蛋白质，如卵清清蛋白等；(2)分子由简单蛋白质与非蛋白质輔基构成的結合蛋白质，如核蛋白、血紅蛋白等。

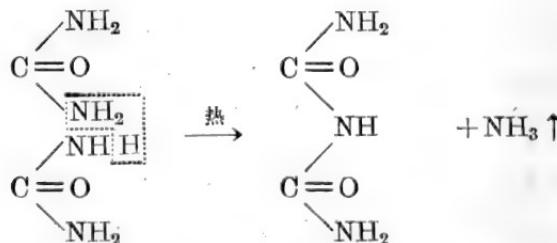
实验十一 蛋白质与个别氨基酸的呈色反应

蛋白质所含的特殊氨基酸或特殊结构，可与某些試剂发生反应，生成有顏色的物质。这些反应非常灵敏，常作为蛋白质或氨基酸定性和定量測定的根据。由于化学結構与氨基酸成分之不同，一种蛋白质未必能起所有蛋白质的顏色反应。氨基酸本身和具有与蛋白质同样結構的非蛋白质物质也呈相应的某些顏色反应。

器材 (1)試管及試管架；(2)10毫升量筒；(3)噴霧器。

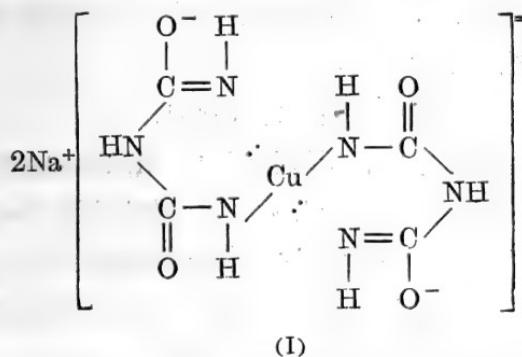
試剂 (1)蛋白质溶液^[17]；(2)未稀釋的鸡蛋白溶液；(3)1% 白明胶溶液；(4)尿素粉末；(5)1% 硫酸銅溶液；(6)0.5% 醋酸鉛溶液；(7) 10% 氢氧化鈉溶液；(8) 20% 氢氧化鈉溶液；(9)0.5% 石炭酸溶液；(10)濃硝酸；(11)濃硫酸；(12)濃醋酸（經常混有乙醛酸）；(13)Millon 氏試劑^[18]；(14)1% 苛三酮溶液；(15)精氨酸溶液 10 毫克/毫升；(16)組氨酸溶液 10 毫克/毫升；(17)20% NaOH；(18) 1% α -萘酚酒精溶液；(19) 次溴酸鈉溶液^[19]；(20)重氮試劑^[20]；(21) 1% 鸡蛋清溶液；(22) 1% 甘氨酸溶液；(23)0.3% 半胱氨酸溶液；(24)5% 亚硝酰铁氯化鈉溶液；(25)飽和硫酸鈉溶液；(26)濃氫氧化銨。

(1)双縮脲反应：当尿素加热时，两分子尿素縮合放出一分子氨而形成双縮脲：



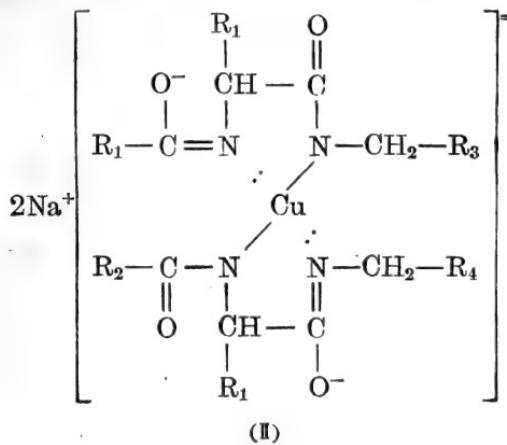
双縮脲在碱性溶液中与 Cu^{++} 結合生成紫紅色的复杂化合物 (I)。

这一呈色反应称为双缩脲反应。



在蛋白质分子中含有多个与双缩脲结构相似的肽键，因此也能呈双缩脲反应，形成紫红色或蓝紫色的复合物(II)。复合物(II)的数量越少，颜色越红。双缩脲反应不仅为含有两个以上肽键的物质（蛋白质和三肽以上的多肽）所有，而含有一个肽键和一个 $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CRH}-\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2-\text{NH}_2-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$ 等基团的物质以及乙二酰二胺

$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{N} \quad \text{H}_2 \\ | \quad \quad | \\ \text{O}=\text{C} \quad \text{C}=\text{O} \end{array}$ 等物质也有此反应^(1,2)



过量铵盐(如硫酸铵)干扰此反应,因为 NH_4^+ 能与 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 形成暗蓝色的络离子, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{++}$ 。多加一些 NaOH 在一定范围内,可以克服这一干扰。

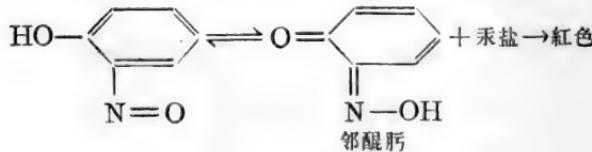
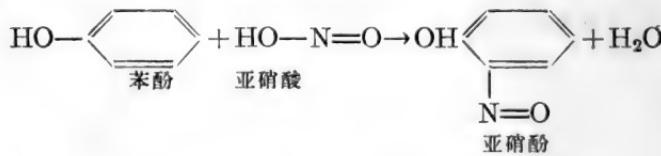
双缩脲反应,可用作蛋白质定量测定。

取少许尿素结晶,放在干燥试管中。用微火加热使尿素熔解。熔解的尿素开始硬化时,停止加热。尿素放出氨,形成双缩脲。

冷后,加10%苛性钠溶液约1毫升并振荡之,再加1%硫酸铜溶液1滴,再振荡。观察出现的粉红色。避免添加过量硫酸铜,否则,生成的蓝色氢氧化铜能掩盖粉红色^①。

向另一试管加蛋白质溶液约1毫升和10%氢氧化钠溶液2毫升。摇匀。再加1%硫酸铜溶液两滴,随加随摇。观察紫玫瑰色出现。

(2)米伦氏反应:1849年Millon⁽³⁾氏发现,一些蛋白质与汞的浓硝酸溶液一起加热时产生颜色,并认为是酪氨酸和其他酚类化合物发生此反应。单酚衍生物与米伦氏试剂作用生成粉红色到暗红色,双酚和吲哚衍生物(如色氨酸)生成黄色到红色。此反应的化学过程还未完全了解,最初产生的有色物质可能是酚的亚硝基衍生物,经变位作用,成为颜色更深的邻醌肟。最终具有稳定红色之产物,成分尚不明了。有人曾用此法作酪氨酸的定量测定⁽⁴⁾。



^① 为了防止生成蓝色氢氧化铜,有人在双缩脲试剂中加入一些乙二醇或甘油。

組成蛋白质之氨基酸中只有酪氨酸为一羟苯衍生物。因此，凡含有酪氨酸的蛋白质均呈此反应。

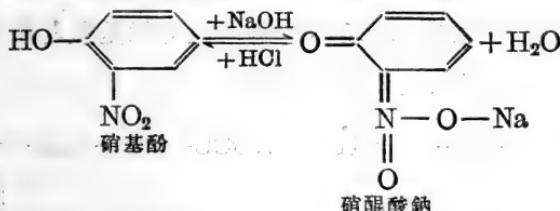
Millon 氏反应不能用来检查尿中蛋白质。尿中无机盐可将試剂中汞离子沉淀，使試剂失效。碱也能沉淀汞离子，因此鉴定碱性溶液时，須先加酸酸化。

取石炭酸（苯酚）3滴，置于試管內并加 Millon 氏試剂約 1.5 毫升。小心加热，并观察顏色变化。

向試管中加蛋白质溶液 2 毫升^① 及 Millon 氏試剂約 0.5 毫升。因为試剂中含汞盐及硝酸，蛋白质凝固沉淀。将試管內容物小心加热^②，沉淀变成磁紅色。避免添加过量的 Millon 氏試剂，因为試剂中含有硝酸，能与許多蛋白結合，产生黃色（蛋白质黃色反应），干扰 Millon 氏反应（这是关键）。

用白明胶作 Millon 氏反应。如白明胶很純，則反应不出現，因为白明胶不含酪氨酸。

(3)蛋白黃色反应：Salkowski 在 1888 年第一次应用这一反应^③。它是含有芳香族氨基酸，特別是含有酪氨酸和色氨酸的蛋白质所特有的呈色反应。在此反应中，硝酸将蛋白质分子中的苯核硝化，产生黃色或橙黃色硝基衍生物。苯核上含有羟基，加碱則顏色变深。这可能由于硝酰酸根的生成所致。



① 此試驗可应用于不溶性蛋白。加 1 毫升試剂于蛋白质中，逐渐加热，则出現粉紅到紅色（决定于酪氨酸的含量）。对于水溶性的脲、胰，则溶液变紅，表示有酪氨酸存在。

② 加热要慢。加热过快，顏色往往看不清楚。

色氨酸产生的紅色比酪氨酸更强，有人认为在反应中色氨酸被硝酸部分氧化⁽⁶⁾。含有苯环的苯丙氨酸和苯很难被硝酸硝化，加入少量濃硫酸則能得到明显的正反应⁽⁷⁾。皮肤、指甲和毛发等遇濃硝酸变黃即为蛋白黃色反应。除蛋白质外，一些芳香族化合物，如石炭酸，也能发生此反应。

取石炭酸溶液約1—2滴放入試管內，并加濃硝酸約1毫升。加热(謹慎!)，观察顏色。

取蛋白质溶液約1毫升置于試管內。添加濃硝酸5—6滴。鸡蛋白凝固沉淀。小心加热，沉淀即变成黃色。

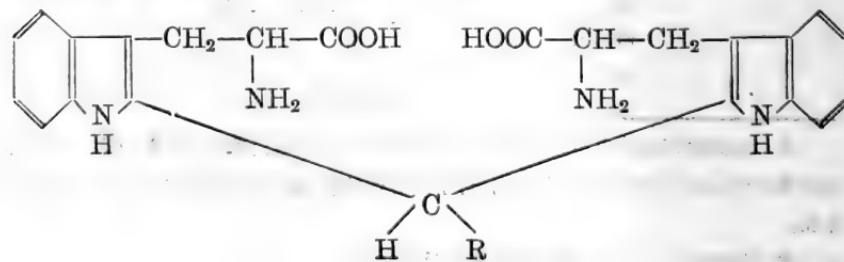
使試管冷却并謹慎地添加过量氨水或氢氧化鈉溶液使成碱性。黃色变成橙黃色。若酸化，又变回黃色。

(4)乙醛酸反应 (Adamkiewicz-Hopkins-Cole 反应)：当向蛋白质溶液中加入乙醛酸($\text{H}-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OH}$)并用濃硫酸重迭时，则

产生紅紫色。此反应与蛋白质分子中的色氨酸有关。

色氨酸在濃硫酸中与一些醛类反应形成有色物质。Adamkiewicz⁽⁸⁾用含有少量醛杂质的冰醋酸，Hopkins-Cole⁽⁹⁾利用乙醛酸作为試剂，Acree-Rosenheim^(10,11)利用甲醛，Voisenet-Phode⁽¹²⁾利用芳香醛——对二甲基氨基苯甲醛——进行反应。

形成的有色产物的性质还不清楚。但可能是醛与两个分子色氨酸脱水縮合形成与靛藍相似的物质。

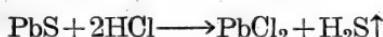
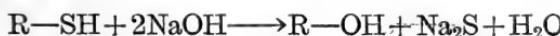


硝酸根、亚硝酸根、氯酸根及过多的氯离子均能妨碍此反应。有微量硫酸铜或 Fe^{+++} 离子存在时，可以加强色氨酸的阳性反应⁽¹³⁾。关于 Hopkins-Cole 反应，Harvey, Miller 和 Robson 作了全面的讨论⁽¹⁴⁾。

向试管中加数滴未稀释的鸡蛋白溶液，再加浓醋酸（常含少量乙醛酸）约 1 毫升。倾斜试管，谨慎地沿管壁加浓硫酸^①约 1 毫升，使其重迭，勿使两者混合。静置后，观察在两液界面上出现的红紫色环^②。

用白明胶作乙醛酸反应。白明胶分子中无色氨酸，所以不呈此反应。

(5) 蛋白质中硫的反应(胱氨酸和半胱氨酸)：蛋白质分子中常有含硫的胱氨酸和半胱氨酸。含硫蛋白质在强碱作用下，分解形成硫化钠，后者与醋酸铅作用形成黑色硫化铅沉淀。若加入浓 HCl，则出现 H_2S 的臭味。



蛋白质中的胱氨酸和半胱氨酸极易脱硫，而含硫的蛋氨酸对强碱相当稳定，不产生此反应。

向试管中先加 0.5% 醋酸铅溶液约 1 毫升，然后慢慢滴加 10% 氢氧化钠溶液，直到产生的沉淀溶解为止^③。摇匀后，再加未稀释

① 硫酸必须是纯的。

② 有时颜色不易形成，可以在水浴中微热。

③ 醋酸铅先与 NaOH 作用形成 $\text{Pb}(\text{OH})_2$ 白色沉淀，它是两性物质，当加入过量的 NaOH 时，与 NaOH 发生反应，形成铅酸钠而溶解。



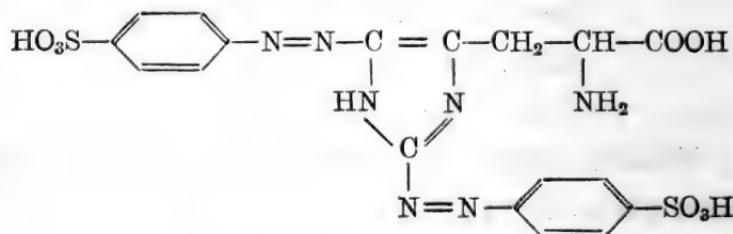
的蛋白质溶液数滴，再混匀。小心加热，则溶液变黑。小心加入 2 毫升浓 HCl，嗅其味，有什么物质？

(6) 糖蛋白的試驗 (Molisch 反应): Molisch 反应是糖的特异反应。糖蛋白中含有糖作为辅基，能呈 Molisch 反应。反应机制，詳見第一章中的糖的呈色反应。

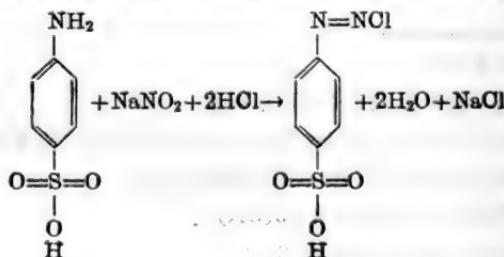
用 2 毫升鸡蛋清蛋白，加 2—3 滴 1% α -萘酚酒精溶液，搖匀。然后仔細地沿管壁加濃硫酸 1 毫升，形成明显的界面。在界面处出現紫色环，表示有糖存在。

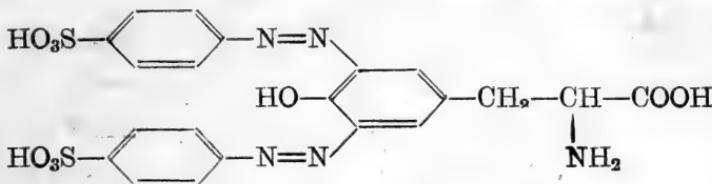
(7) 偶氮反应 (Ehrlich 反应): 偶氮化合物与酚核或咪唑环結合产生顏色物质。因此，蛋白质中酪氨酸和組氨酸能发生这一反应。酪氨酸产生較不明显的橙紅色，而組氨酸产生鮮紅色产物。組胺、硫組氨酸甲基內盐(ergothioneine)、酪胺、腎上腺素和胆色素也能发生此反应。

偶氮苯磺酸^①与組氨酸和酪氨酸反应的产物如下：



^① 偶氮苯磺酸是由对氨基苯磺酸与 NaNO₂ 和 HCl 作用形成：





Kappeller-Adler 对此法作了综述⁽¹⁵⁾。

取 2 支試管，分別加入組氨酸溶液和鸡蛋白溶液（稀釋 20 倍）1 毫升，各加入新配制的重氮試劑^① 1 毫升，搖勻。加入 1 毫升 20% NaOH，再搖勻。过几分钟，观察顏色的形成。一般出現櫻桃紅色。

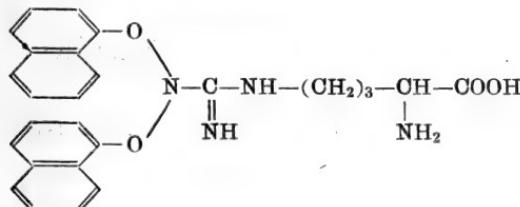
(8) 坂口氏反应 (Sakaguchi 反应)：1925 年 Sakaguchi⁽¹⁶⁾ 观察到精氨酸与 α -萘酚在碱性次氯酸鈉溶液中发生反应，产生紅色的产物。次溴酸鈉与次氯酸鈉一样有效，且比較方便。許多胍代化

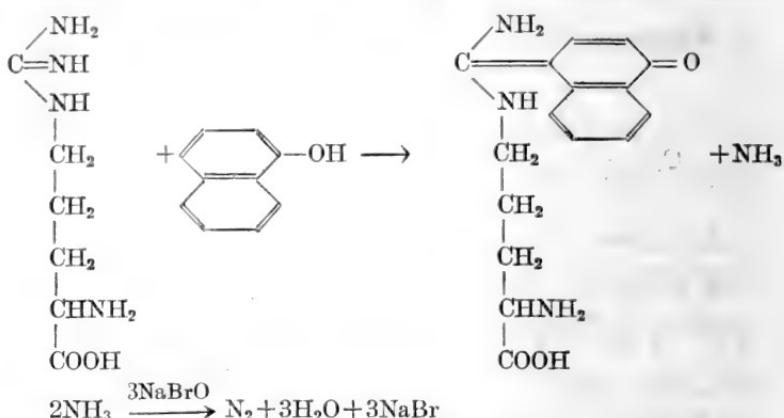
合物，如胍乙酸、甲胍 $\left(\text{CH}_3\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2 \right)$ 、胍基丁胺等也发生此反

应。精氨酸是唯一呈正反应的氨基酸，反应灵敏度达 1:250,000。反应方程式如下^{(17)②}：

① 偶氮試劑放置不能超过一昼夜，否則失效。A、B 两种母液，则在半年內穩定。

② 有人⁽¹⁸⁾认为，产生的顏色物质是：





生成的氨可被次溴酸鈉氧化成氮。在次溴酸鈉緩慢作用下，有色物质繼續氧化。 α -氨基破裂，引起顏色消失，因此过量的次溴酸鈉对反应不利。加入濃尿素，破坏过量的次溴酸鈉，增加顏色的稳定性。酪氨酸、組氨酸、色氨酸和氨能减低产生顏色的强度，甚至阻止顏色的形成。

此反应可以用来定性鉴定含有精氨酸的蛋白质和精氨酸的定量測定⁽¹⁹⁾。

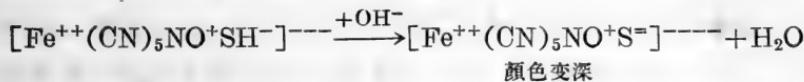
取 2 支試管，分別加入 1 毫升精氨酸溶液和鸡蛋白溶液，各加 20% NaOH 5 滴，1% α -萘酚酒精溶液 2 滴及次溴酸鈉溶液 6 滴。搖勻，放置片刻，注意出現顏色⁽¹⁾。

(9) 羰基的呈色鉴定：这一反应是一-SH 产生的。在碱性条件下，含有一-SH 的化合物如半胱氨酸⁽²⁾与亚硝基铁氰化鈉反应形成紫紅色物质。胱氨酸被 KCN 还原成半胱氨酸后，也呈正反应。反应式如下⁽²⁰⁾。



⁽¹⁾ 应避免加入过量的 α -萘酚和次溴酸鈉溶液。前者过量，溶液易呈棕色，后者过量，则反应物迅速退色。

⁽²⁾ H₂S 也能发生反应。

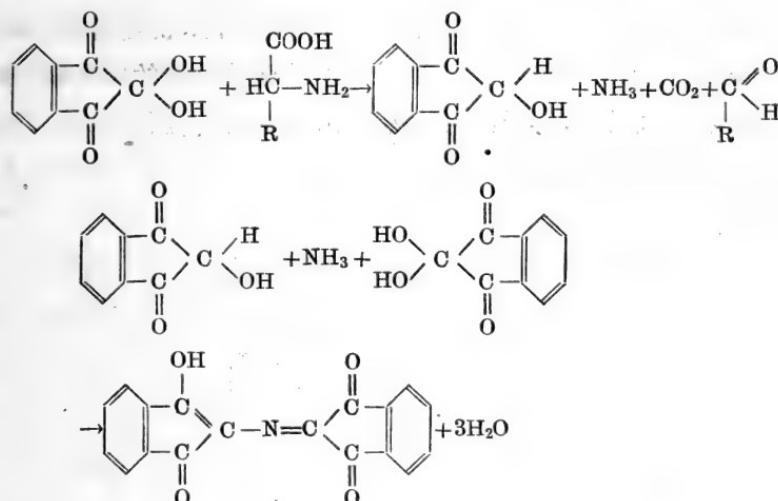


(1) 在滴点反应板上, 混合 2 滴 0.3% 半胱氨酸溶液, 3 滴 10% NaOH, 0.5 毫升 5% 亚硝基铁氰化钠溶液^①。观察出现紫红色。颜色容易消退。

(2) 向 3 毫升鸡蛋蛋白溶液, 加入 3 毫升饱和硫酸铵、2—3 滴 5% 亚硝基铁氰化钠。并加入饱和氢氧化铵碱化。观察出现的紫红色。

(10) 苛三酮反应: 此反应是所有氨基酸共有的反应。反应十分灵敏, 1:1500,000 的氨基酸水溶液即能发生反应。Ruhemann^(21,22) 在 1910 年首次用它来鉴定氨基酸。反应在 pH 5—7 溶液中进行最好。

氨基酸与苛三酮的反应分为两个步骤, 第一步是氨基酸被氧化形成 CO₂、NH₃ 和醛, 苛三酮被还原成还原型苛三酮; 第二步是所形成的还原型苛三酮同另一个苛三酮分子和 NH₃ 缩合生成有色物质。



① 注意亚硝基铁氰化钠有毒。

脯氨酸与茚三酮反应产生不很强的黄色^①。 β -丙氨酸、氨和许多一级胺都呈正反应。尿素、马尿酸、二酮吡嗪和肽键上的亚氨基不呈现此反应。

此反应已发展成氨基酸定量测定法。我们可以用比色法测定反应生成的颜色的深浅⁽²³⁾，或者用气量法⁽²⁴⁾测定生成的二氧化碳的多少。

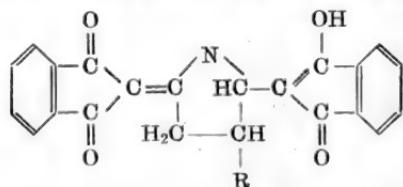
(1) 取2支试管，分别加入4毫升2%酪蛋白溶液和M/10甘氨酸溶液，再各加1毫升0.1%茚三酮溶液，混匀。至沸水浴中加热3—5分钟，放置冷却。出现粉红、紫红到蓝色。

(2) 在一块滤纸片上滴加2滴M/10甘氨酸溶液，在60°C烘箱中烘干。用0.1%茚三酮酒精溶液喷湿，再烘干。观察出现的紫红色斑点。

实验十二 蛋白质的可逆沉淀

与其他胶体溶液相似，蛋白质溶液不稳定。在多种物理的和化学的因素影响下，蛋白质颗粒失去电荷或脱水，沉淀析出。此时蛋白质分子并未发生显著的化学变化，将致使沉淀的因素除去时，蛋白质沉淀能再溶解于原来的溶剂中。这种沉淀反应，称为可逆沉淀反应或不变性沉淀反应。

① 脯氨酸和羟脯氨酸的黄色反应产物可能是下列物质⁽²⁵⁾。



脯氨酸, R=H

羟脯氨酸, R=OH

用中性盐盐析蛋白质和低温下用乙醇或丙酮短时间处理蛋白质而使其沉淀的反应，均为可逆沉淀反应。

器材 (1)試管及試管架；(2)小漏斗。

試劑 (1)蛋白质氯化鈉溶液^[21]；(2)蛋白质溶液^[17]；(3)硫酸銨饱和溶液；(4)硫酸銨結晶粉末；(5)氯化鈉結晶粉末；(6)1%醋酸；(7)95%乙醇。

(1)蛋白质的盐析作用：于蛋白质溶液中，加中性盐至一定浓度，蛋白质即被沉淀析出。这种作用叫做盐析。盐析的机制不甚明了，可能因为：(1)蛋白质分子所带之电荷被中和；(2)蛋白质分子被盐脱去水化层。沉出的蛋白质化学性质未变，减低盐的浓度时，仍能溶解。

用一种盐来进行盐析时，不同蛋白质需要的浓度不同，这样可以进行蛋白质分级盐析。例如，向含有清蛋白和球蛋白的鸡蛋白溶液中加硫酸镁或氯化钠至饱和，或加硫酸銨至半饱和，则球蛋白^①沉淀析出。在等电点时，清蛋白可被饱和硫酸镁或氯化钠或半饱和硫酸銨溶液沉淀析出。

于試管內，加蛋白质氯化鈉溶液^②和饱和硫酸銨溶液各5毫升，并混合之。靜置数分钟，观察析出的球蛋白沉淀。将試管內容物过滤，向滤液中添加硫酸銨粉末至饱和，清蛋白沉淀析出^③。

另取試管1支，加蛋白质氯化鈉溶液約3毫升。向試管內添加氯化鈉粉末至饱和，数分钟后，观察析出的球蛋白沉淀。将試管內容物过滤。向滤液內添加稀醋酸半滴至一滴，使滤液呈弱酸性，

① 包括各种α、β和γ球蛋白。

② 本实验有的用蛋白质氯化鈉溶液，有的用蛋白质溶液，蛋白质氯化鈉溶液中含有球蛋白和清蛋白，在蛋白质溶液中球蛋白已沉淀除去。

③ 硫酸銨一定要加足量，否則，不出現沉淀。

有清蛋白沉淀析出^①。

(2)用乙醇沉淀蛋白质：蛋白质不溶于中性有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮等)。因此，如果向蛋白质水溶液中添加乙醇，至一定浓度时，则产生蛋白质沉淀。此时溶液应为中性或弱酸性。沉淀不同蛋白质所需要的乙醇的浓度不同，乙醇能使蛋白质胶体颗粒脱水，因而降低其在溶液中的稳定性。溶液中如有少量中性盐(例如氯化钠)沉淀的形成更加迅速而完全。

如将所得蛋白质沉淀和乙醇迅速分离，则仍能在水中溶解。这说明沉淀出来的蛋白质性质未变，这种沉淀是可逆的。但若在乙醇中放置时间较长，则蛋白质变性而不再溶于水。

在2支試管中，各加入2滴未稀釋的鸡蛋白和1毫升水，有沉淀形成(什么物质?)。加一滴饱和硫酸銨，溶液变清亮(为什么?)。各加1毫升冷酒精，搖匀，立刻在一管中加入10毫升蒸餾水，搖匀。半小时后，向另一管中加入10毫升蒸餾水，搖匀。比較两管的混浊度，并解釋之^②。

实验十三 蛋白质的不可逆沉淀

許多物理和化学因素可使蛋白质发生不可逆沉淀。在不可逆沉淀反应中，蛋白质已变性，不能再溶解于原来的溶剂中。变性蛋白质分子的内部构造发生改变，暴露出大量憎水基团，蛋白质变为憎水胶体。重金属盐、植物碱試剂、无机酸、光、热、震荡和超声波均能使蛋白质发生不可逆沉淀而析出。

器材 (1)試管及試管架；(2)玻璃棒。

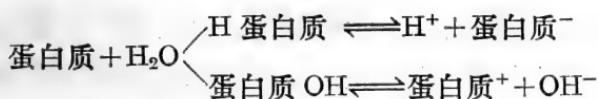
試剂 (1)蛋白质溶液^[17]；(2)0.5% 醋酸鉛溶液；(3)饱和和

① 加醋酸要适量，否则得不到沉淀。另外加的氯化钠量一定要达到饱和。

② 卵清蛋白极易被酒精变性。因此在本实验中即使是立刻稀釋，也可能有部分清蛋白变性而使溶液混浊。

0.1% 硫酸銅溶液；(4)3% 硝酸銀溶液；(5)0.5% 升汞溶液；(6)苦味酸飽和溶液；(7)鞣酸飽和溶液；(8)1% 醋酸；(9)碘化鉀-碘化汞溶液^[22]；(10)10% 盐酸；(11)5% 亞鐵氯化鉀溶液；(12)濃盐酸；(13)濃硝酸；(14)濃硫酸；(15)15% 三氯醋酸；(16)20% 磺基水楊酸溶液。

(1) 重金屬盐沉淀蛋白质：蛋白质在水溶液中是酸碱两性物质，可用下列方程式表示



在碱性溶液中蛋白质解离成蛋白质负离子。蛋白质负离子能与带正电荷的金属离子结合成蛋白质盐。如果形成的盐难溶于水，则蛋白质沉淀析出。在有机体内，蛋白质常以其可溶性的鈉盐或鉀盐的形式存在。当加入汞、鉛、銅、鎘、鋅等重金屬盐时，则蛋白质形成不溶性的汞、鉛、鋅、銅、鎘等蛋白质盐。重金屬盐沉淀蛋白质往往引起蛋白质变性。

重金屬盐类沉淀蛋白质的反应通常很完全（特别是有碱金属盐类存在时）。因此，在生化分析上，常用重金屬盐除去液体中的蛋白质（同理，可用蛋白质解除重金屬盐食物性中毒）。但应注意，使用某些重金屬盐沉淀蛋白质时，例如用醋酸鉛或硫酸銅时，不可过量，否则引起沉淀的再溶解^①。

取4支試管，各加蛋白质溶液2毫升，然后小心地分別滴加以下4种試剂各数滴。向第1試管滴加0.5% 醋酸鉛溶液，第2試管滴加0.1% 硫酸銅溶液，第3試管滴加3% 硝酸銀溶液，第4試管滴加0.5% 升汞溶液（毒物！）。观察沉淀的生成。

^① 有人认为，这种再溶解現象是由于过量的金属离子被蛋白质选择吸附，从而使蛋白质带上同种电荷，相互排斥而溶解。加入过量的NaCl可以使蛋白质汞盐沉淀溶解的道理，同上。

在第 1 和第 2 两个試管中，分別滴加过量醋酸鉛和饱和硫酸銅溶液，观察沉淀的溶解。

(2)植物碱試剂沉淀蛋白质：鞣酸、苦味酸、 $KI-HgI_2$ 、 $H_4Fe(CN)_6$ 、 $KI-BiI_3$ 等植物碱試剂能和蛋白质結合生成沉淀。蛋白质和植物碱含有相似的含氯基团，这可能是植物碱試剂也能沉淀蛋白质的原因。在制革工业中，常用鞣酸来鞣革。在医药中，用苦味酸药膏来沉淀伤口外渗的血浆蛋白。

植物碱試剂沉淀蛋白质作用需在酸性环境下进行。碱性环境能溶解沉淀。因为在此反应中，蛋白质以正离子形式与試剂的負离子发生反应，形成不溶性复合物。

取 2 支試管，各加約 2 毫升蛋白质溶液。滴加少量 1% 醋酸溶液使成酸性。向一試管添加飽和鞣酸溶液數滴，另一試管添加苦味酸飽和溶液數滴。观察蛋白质沉淀。

另取 1 支試管，注入約 2 毫升蛋白质溶液，用 1% 醋酸溶液使成酸性。滴加 5% 亚铁氯化鉀溶液。在每加一滴之后，振蕩，观察蛋白质的沉淀。

再取一支試管加蛋白质溶液約 2 毫升。加 10% 盐酸使呈微酸性，而后添加数滴碘化鉀-碘化汞溶液。观察蛋白质沉淀。

(3)用矿酸沉淀蛋白质：濃矿酸类(H_3PO_4 除外)能使蛋白质发生不可逆的沉淀反应。这种沉淀作用可能是蛋白质顆粒脱水的結果。除硝酸外，过量的矿酸能溶解沉出的蛋白质。

用硝酸沉淀蛋白质的反应特別重要。在临床診斷上常用以檢查尿中蛋白质。

取 3 支試管，分別加入濃盐酸、濃硫酸和濃硝酸各約 1 毫升。小心地向 3 支試管中各注入蛋白质溶液約 1 毫升。观察两种液体界面处有白色环状蛋白质沉淀出現。

小心振蕩每个試管。蛋白质沉淀应在过剩的盐酸及硫酸中溶

解(有时盐酸不足,再多加些)。在含硝酸的試管中,虽經振蕩,蛋白质沉淀亦不溶解。

(4)用有机酸沉淀蛋白质: 有机酸能使蛋白质沉淀。不同的有机酸对蛋白质的沉淀效应不同,三氯乙酸和磺基水楊酸最有效,能将生物体液中的蛋白质(例如血清中的蛋白质)完全除去,因而广泛地被使用。如拟除掉滤液中的三氯醋酸,可将滤液煮沸。三氯醋酸分解成氯仿和二氧化碳而挥发。

取試管2支,各加入蛋白质溶液約2毫升。分別滴加15%三氯醋酸溶液和20%磺基水楊酸溶液各数滴。观察蛋白质的沉淀。

(5)加热沉淀蛋白质: 几乎一切蛋白质都加热而凝固。不同蛋白质的凝固溫度不同,有一些蛋白质在50—55°C即凝固,另一些蛋白质却能經受短暫的煮沸而不凝固。

在凝固时,蛋白质变性,变成不可逆的不溶状态。加热变性蛋白质的分子构造发生改变,失去天然蛋白质的一些性质。变性反应与加热时间并进,但随溫度升高而急剧地加速。极短时间的加热可能不引起蛋白质凝固。

盐类的多少及氯离子濃度对蛋白质加热凝固有重要影响。当蛋白质处于等电点时,加热凝固最完全和最迅速。少量盐类有助于蛋白质的加热凝固。

在酸性溶液內,蛋白质胶粒带有正电荷。在碱性溶液中,蛋白质胶粒带负电荷。在这两种情形下,蛋白质溶液加热不凝固。若同时溶液中有足量的某些中性盐,也能凝固。

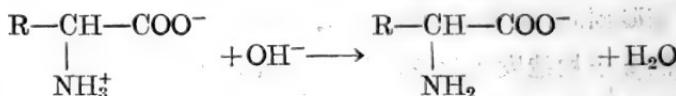
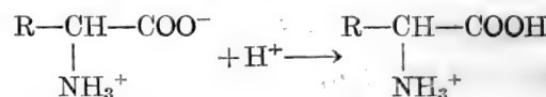
取5支試管,各加蛋白质溶液約2毫升。将第1支試管加热。观察蛋白质凝固沉淀。在第2支試管內加入1%醋酸1滴再加热^①。蛋白质凝固沉淀較迅速和較完全。在第3支試管中加約0.5毫升

① 注意不要多加醋酸,有时只要半滴即可,过多会得到相反結果。

10%醋酸并加热。观察有无沉淀。在第4支試管中加入約0.5毫升10%醋酸和几滴飽和氯化鈉溶液。加热，观察蛋白质沉淀，并与第3支試管比較。在第5支試管內，加入約0.5毫升氢氧化鈉溶液并加热。观察并解釋結果。分別用碱和酸中和第4和第5支試管的溶液，結果沉淀析出，为什么？

实验十四 蛋白质等电点的测定

蛋白质分子为两性电解质，含有自由氨基、羧基和酚基、—SH基、胍基、咪唑基等酸碱基团。在酸性溶液中蛋白质变成阳离子，在碱性溶液中，游离成阴离子：



在一定氢离子浓度时，蛋白质分子的酸性解离与碱性解离相等，成为中性颗粒，所带正负电荷数目相等；在电场内，蛋白质既不向阴极移动，也不向阳极移动。这时的pH值，称为蛋白质的等电点。蛋白质等电点多接近于pH 7.0。略偏酸性的等电点也很多，如白明胶的等电点为pH 4.7。也有偏碱性的，如精蛋白等电点为pH 10.5—12.0。在等电点时，蛋白质溶解度最小，容易沉淀。

器材 (1)試管及試管架；(2)微量刻度吸量管；(3)10毫升刻度吸量管。

試剂 (1)0.1N 醋酸鈉溶液；(2)0.1N 醋酸；(3)1N 醋酸；(4)1% 白明胶溶液；(5)95% 乙醇；(6)酪蛋白-醋酸鈉溶液^[23]。

(1)白明胶等电点的测定^①：白明胶易溶于水。同其他pH比

① 在本实验和下一个实验中，量取各种溶液必须准确。

較，在等电点时，适量的酒精能将白明胶沉淀析出。

操作 取 6 支試管并标号，按下表添加試剂。

試 劑	試 管 號 碼					
	1	2	3	4	5	6
0.1N 醋酸鈉溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
0.1N 醋酸	0.25	0.50	1.0	2.0	4.0	—
1N 醋酸	—	—	—	—	—	0.80
蒸餾水	3.75	3.5	3.0	2.0	—	3.2
1% 白明胶溶液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
pH	5.6	5.3	5.0	4.7	4.4	4.1

振蕩混勻各試管內容物。向第 4 号試管內，用吸量管慢慢滴加乙醇，直至出現輕微混浊为止。隨加隨搖，不可多加。約需 8 毫升。按照第 4 号試管的乙醇用量，向其余 5 個試管準確地添加同量乙醇。10 分鐘和 30 分鐘後，觀察比較各管的混浊度，并作表，用—、±、+、++、+++ 等符號來表示各管的混浊度。指出白明胶的等电点。

(2) 酪蛋白等电点的测定：酪蛋白在等电点时的溶解度很低。牛乳变酸后产生的沉淀即为酪蛋白在等电点沉淀析出的現象。

操作 取 9 支試管并标号，按下表添加試剂。

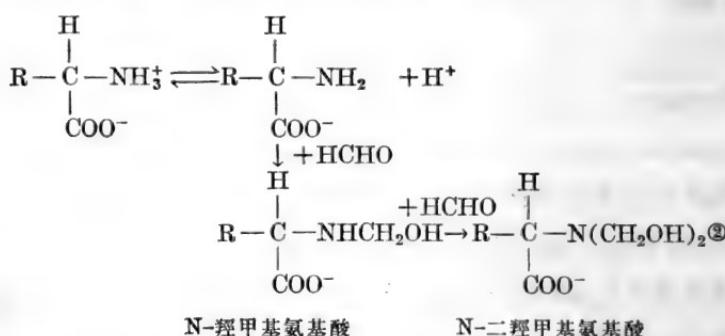
試 劑	試 管 編 號								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蒸餾水(毫升)	8.38	7.75	8.75	8.5	8	7	5	1	7.4
0.01N 醋酸	0.62	1.25	—	—	—	—	—	—	—
0.1N 醋酸	—	—	0.25	0.5	1	2	4	8	—
1.0N 醋酸	—	—	—	—	—	—	—	—	1.6

向各管各加入 1 毫升酪蛋白-醋酸鈉溶液，振蕩混勻。注意比較搖勻時及經過 10 分鐘之後各管的混浊度，并作表。用—、±、+、

++、+++等符号来表示各管的混浊度。指出酪蛋白的等电点。

实验十五 Sörensen 氏甲醛滴定法

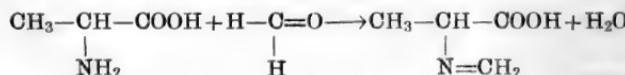
蛋白质和氨基酸的 $-\text{NH}_3^+$ 的 pK 值常在9.0以上，不能用一般酸碱指示剂（包括酚酞）作滴定测量^①。但可用Sörensen氏的甲醛滴定法测量⁽²⁶⁾。用甲醛处理氨基酸，甲醛与氨基结合，



结果使滴定曲线向酸性方向移动，移动的多少决定于溶液中的甲醛浓度^③。当滴定终点移至pH9左右时，即可用酚酞作指示剂，用碱来滴定 $-\text{NH}_3^+$ 上的 H^+ 。如蛋白质或氨基酸分子中的一 $-\text{NH}_3^+$ 基数目与 COO^- 基相等，甲醛滴定所滴定的虽然是氨基，也可以说是羧基。如果 $-\text{NH}_3^+$ 基和 COO^- 基的数目不相等，甲醛滴定的结果不能代表羧基。

^① 为了复习酸碱滴定原理和选择指示剂原理，建议先作后边的甲醛滴定补充实验。

^② 早先认为形成次甲基氨基酸，



现在知道是形成N-羟甲基氨基酸，并没有水释放出来。

^③ 甲醛的浓度很重要，浓度不足会使数值过低，因为终点没有提到pH9左右。最好使甲醛的浓度在滴定完成时达6—9%。

甲醛滴定法简单易行，但不能准确地测定蛋白质水解液中的氨基数量。测定标准氨基酸时，其误差可达10%左右。脯氨酸与甲醛作用时，产生不安定的化合物，测定的结果略低。酪氨酸由于含有酚基，可能使结果过高。有关甲醛滴定的理论叙述，见参考书目^(27,28)。方法方面一些问题，见参考书目⁽²⁹⁾。

器材 (1)100毫升锥形瓶；(2)吸量管；(3)滴定管。

试剂 (1)约0.1N的甘氨酸溶液；(2)0.1N氢氧化钠标准溶液；(3)0.5%酚酞酒精溶液；(4)中性甲醛溶液^[24]。

操作 取3个标有号码的100毫升锥形瓶。于第1、2号两瓶内各加甘氨酸溶液2毫升，水5毫升及酚酞指示剂5滴。于第3号瓶内加入7毫升蒸馏水及指示剂5滴作对照。摇匀后，由滴定管中滴加0.1N氢氧化钠溶液至桃红色^①。保留第1号锥形瓶作比色标准，于第2、3号中各加中性甲醛溶液2毫升，再用0.1N氢氧化钠溶液滴定至与标准液颜色相同为止。向第1号瓶内加中性甲醛2毫升，用0.1N氢氧化钠滴定至红色，颜色深度与第2号瓶相同为止^②。计算溶液中的氨基氮的毫克数。

甲醛滴定补充实验

为了复习酸碱滴定知识和更好的体会甲醛滴定的意义，进行以下滴定实验。在进行实验前，复习定量分析化学与酸碱滴定和指示剂选择原理有关的讲演讲义和实验讲义。

实验 取3个50毫升锥形瓶并标号，从25毫升滴定管准确

① 滴定终点颜色的确定很重要，而说法不同。按我们的经验，滴定至桃红色为最适宜。

② 当溶液中含有大量的铵盐时，滴定结果偏高。因为铵与甲醛作用形成6-次甲基4氯，应放出铵盐的酸，其反应如下：



地量入 5 毫升 $0.1N$ HCl 并各加 5 毫升水。分别加入 2—3 滴 0.1% 溴甲酚綠 (BCG)、酚紅 (PR) 和酚酞 (PP) 的酒精溶液。用 $0.1N$ NaOH 滴定到終点，并記錄結果。

从另一 25 毫升滴定管量取 5cc $0.1N$ 醋酸 3 份。重复以上滴定实验，并记录结果。

参考酸碱滴定曲线图，解释你的实验结果。

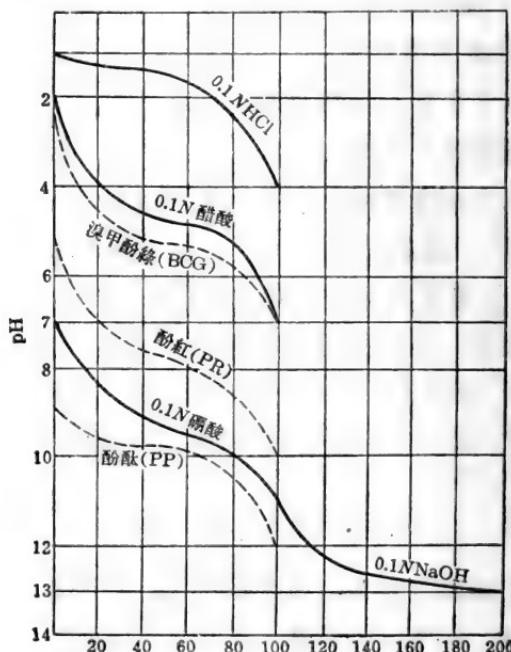


图 4. 酸碱滴定曲线。

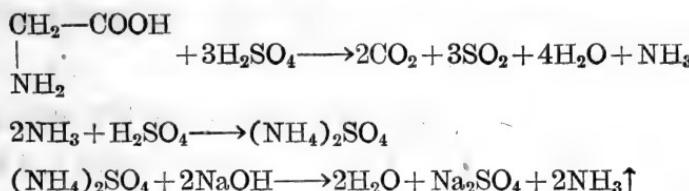
实验十六 总氮量的测定

微量凯氏 (micro-Kjeldahl) 定氮法

天然有机物(如蛋白质和氨基酸等化合物)的含氮总量通常用微量凯氏定氮法来测定。方法的原理简述如下。

用浓硫酸消化时，天然的含氮有机化合物分解成氨，氨与硫酸

化合生成硫酸铵。分解反应进行很慢，可借硫酸铜和硫酸钾（或硫酸钠）来促进。硫酸铜为催化剂，硫酸钾或硫酸钠可提高消化液的沸点^①。消化完了后，用强碱碱化消化液使硫酸铵分解，放出氨。借蒸汽蒸馏法，将氨蒸入过量标准无机酸溶液中，然后用标准碱溶液进行滴定。以甘氨酸为例，经过的化学反应如下。



收集氨的酸性溶液也可用硼酸溶液，氨与溶液中氢离子结合生成铵离子，使溶液中氢离子浓度减低。然后再用标准无机酸滴定，直至恢复溶液中原来氢离子浓度为止。所用无机酸的当量数量即相当于未知物中氨的当量数量。本法适用范围约为0.2—1.0毫克氮。有关凯氏定氮的一些文献，见参考书目⁽³⁰⁻³³⁾。

器材 (1)50毫升凯氏烧瓶4个；(2)50毫升锥形瓶5个；(3)5毫升微量滴定管；(4)5毫升吸量管；(5)1毫升和2毫升奥氏吸量管；(6)50毫升量瓶；(7)10毫升量筒；(8)表面皿；(9)凯氏消化架；(10)凯氏蒸馏装置。

试剂 (1)猪血清^[25]；(2)无氨浓硫酸；(3)粉末硫酸钾-硫酸铜混合物($\text{K}_2\text{SO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 5:1$)；(4)30%氢氧化钠；(5)2%硼酸；(6)混合指示剂^[26]；(7)0.01N标准盐酸溶液；(8)标准硫酸铵溶液(0.3毫克氮/毫升)。

操作 (1)样品制备：取50毫升量瓶，用奥氏吸量管量加血清

① 促进剂的种类很多，可以用3:1、6:1或10:1的 $\text{K}_2\text{SO}_4-\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 混合物。还有人使用由80份 K_2SO_4 ，20份 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 与0.3份 SeO_2 （或0.34份 Na_2SeO_4 ）充分研细混合的混合物。少量 HgCl_2 （约0.032克/克促进剂）可以加速賴氨酸和組氨酸的消化分解。

1 毫升。用蒸餾水稀釋到刻度，混勻備用。溶液如顯渾濁，加少量氯化鈉，再混勻。

(2) 消化：準備 4 個 50 毫升凱氏燒瓶，並標號。向第 1、2 兩燒瓶內，用奧氏吸量管，仔細地，各加入 2 毫升稀釋血清溶液。注意，將溶液加到燒瓶底部，勿使溶液粘燒瓶口及瓶頸。于 3、4 兩號燒瓶中各加入 2 毫升蒸餾水，作為空白對照（用以測定試劑中可能含有的微量含氮物質）。

在每個凱氏燒瓶中先加硫酸鉀-硫酸銅混合物約 100 毫克，再用量筒加濃硫酸 1.5 毫升，（不能用吸量管！）。將以上 4 個凱氏燒瓶放在凱氏消化架（圖 5）上（如無消化架在通風厨內消化）。用小火焰加熱煮沸。待瓶內水汽蒸完，硫酸開始分解放出 SO_3 白煙後，調節火焰保持瓶內液體輕微沸騰，繼續消化，直至消化液几乎無顏色為止（黃色表示消化尚未完全）。全部消化過程約需 1—2 小時^①。消化完了後，關閉火焰。取下燒瓶放在通風橱內冷卻至室溫。

(3) 蒸餾：取 50 毫升錐形瓶 5 個，用蒸汽洗滌（圖 5）2—3 分鐘（圖 6）。冷後，用吸量管各加入 2% 硼酸溶液約 5 毫升及混合指示劑 4 滴（約 0.05 毫升）。溶液應呈棕紫色。用表面皿復蓋備用。

先煮沸蒸汽發生器（圖 7）。器中盛有用幾滴硫酸酸化過的蒸餾水，關閉夾子，使蒸汽通過反應室，由冷凝器下端逸去。在冷凝器下端放一空燒杯以承接凝聚的水滴。這樣用蒸汽洗滌蒸餾器約 10 分鐘後，在冷凝器下端放一盛有硼酸溶液的錐形瓶，位置傾斜如圖。冷凝器頂端應完全浸沒在液體內。繼續蒸汽洗滌 1—2 分鐘。觀察錐形瓶內液體是否變色。如不變色，則證明蒸餾器內部干淨。向下移動錐形瓶使硼酸液面離開冷凝管口約 1 厘米，繼續通蒸汽

^① 含有較多賴氨酸或組氨酸的樣品，需要消化時間較長。應該注意，消化液變清亮並不一定說明消化完全。

1分钟。最后，用水冲洗冷凝器管外口，减小火焰。打开夹子^①，准备下一步把消化液移入蒸馏器内^②。

为了把凯氏消化瓶内的溶液移到蒸馏器反应室内时，不使溶液粘联在消化瓶口上，可先在瓶“下口唇”薄薄塗敷一层凡士林，再把烧瓶中之溶液沿“下口唇”细心地由小玻杯注入反应室。用蒸馏水将凯氏烧瓶冲洗3次（每次用2毫升），把洗液倾入反应室。塞紧棒状玻塞。取另一含有硼酸溶液的锥形瓶，放在冷凝器下，使冷凝器顶端完全浸没在液体内。位置倾斜如图。

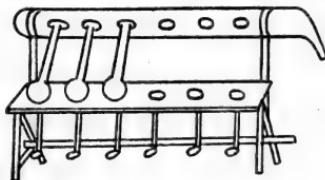


图5. 凯氏消化架。

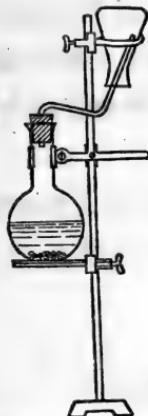


图6. 用水蒸汽洗涤锥形瓶。

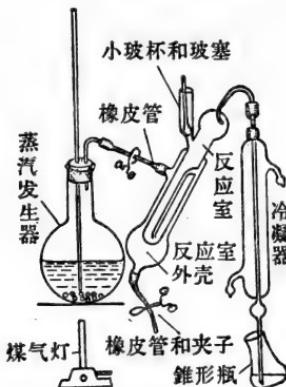


图7. 凯氏蒸馏装置。

取30%氢氧化钠溶液约10毫升放入小玻杯，轻提棒状玻塞，使之慢慢流入反应室。当未完全流入时，将玻塞盖紧，向玻杯中加

^① 掌握夹子和玻塞很重要。若玻塞不紧，也不用水封闭，则有氯逸出的危险。在加样时一定要打开夹子，而且一定要在蒸汽发生后才能关闭，否则就会发生样品倒吸现象。

^② 在蒸馏样品和空白对照以前，为了练习蒸馏和滴定操作，可用标准硫酸铵溶液试作实验2—3次。每毫升标准硫酸铵溶液含0.3毫克氮，每次用2毫升试蒸。

蒸馏水約3毫升。再輕提棒塞，使一半蒸馏水流入反应室，一半留在玻杯中作水封。用煤气灯加热水蒸汽发生器，沸騰后，夹紧夹子开始蒸馏。錐形瓶中硼酸溶液由棕紫色变成藍綠色，自变色起記时，蒸馏3—5分钟。移动錐形瓶使硼酸液面离开冷凝管約1厘米，并用少量蒸馏水洗滌冷凝管口外面，繼續蒸馏一分钟，挪开錐形瓶，用表面复盖錐形瓶。最后松开夹子，移去煤气灯，待其余3个凱氏燒瓶中溶液蒸馏完了后，一同滴定。

在一个蒸馏完毕后，为了洗滌反应室，擰紧夹子，一手捏紧橡皮管，一手輕提棒状玻塞，使冷水迅速流入反应室。因反应室外壳內蒸汽冷縮，結果反应室中的殘液自动吸入反应室外壳，塞住玻塞，取蒸馏水約20毫升加入小玻杯，启开玻塞，冷水再次由小玻杯流入反应室，又自动吸出。如此冲洗3—4次，把夹子打开，排除反应室外壳中积水。关闭夹子，再使蒸汽通过全套蒸馏仪数分钟后，繼續下一个蒸馏。

(4)滴定：全部蒸馏完毕后，以0.01N盐酸滴定各錐形瓶中收集的氨量，直至硼酸溶液出显淡紫色为止(即滴定終点)^①。計算血清的总氮量。

实验十七 双缩脲比色法测定蛋白质

双缩脲顏色反应可用来定量測定蛋白质。在一定实验条件下，把被檢溶液与双缩脲試剂反应后生成的顏色与标准蛋白质溶液作比較。标准蛋白质溶液可用血清清蛋白，鸡子清蛋白或酪蛋白等配制。在这里，我們假定，未知蛋白质的量相等时，双缩脲反应生成的顏色深淺度相等。

器材 (1)試管；(2)1毫升、5毫升吸量管各1个；(3)光电比

^① 蒸馏和滴定时，空气中不能有酸性或碱性蒸汽。

色計。

試劑 (1)双縮脲試劑^[27]; (2)蛋白質溶液(1—10毫克蛋白質/毫升); (3)標準酪蛋白溶液, 每毫升含酪蛋白10毫克。

操作 向1.0毫升含有1—10毫克蛋白質的溶液中, 加入4.0毫升双縮脲試劑。混勻。在室溫20—25°C下, 靜置30分鐘。在光電比色計或分光光度計上540—560毫微米區域測定消光系數(或透光度)。取1.0毫升水或合適的鹽溶液作空白試驗。用光電比色計測定未知溶液消光系數時, 以它來校正零點。

為了繪制標準曲線, 另取5個試管並標號。分別量入0.2、0.4、0.6、0.8和1.0毫升標準酪蛋白溶液, 加水稀釋至1毫升。按照上法用4毫升雙縮脲試劑顯色後, 測定消光系數。

將所得消光系數與酪蛋白溶液的濃度繪制標準曲線。未知樣品中蛋白質的含量可根據其消光系數在標準曲線上求得。

有大量脂肪性物質同時存在時, 將產生混濁的反應混合物。這可用乙醇或石油醚澄清, 离心後再測定讀數。

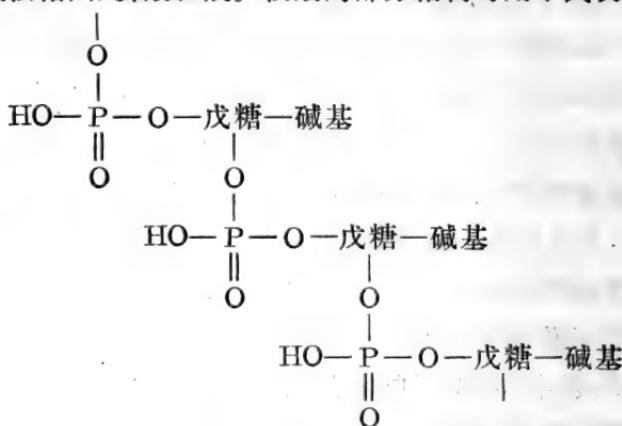
核蛋白的化學

核蛋白是一類重要的結合蛋白質。它是一切生物體必不可少的組成成分。它與生長、發育、遺傳、繁殖等生命現象有密切關係。因為核蛋白在蛋白質的合成中具有特別重要的意義, 迅速生長的器官和組織(胚胎組織和腫瘤)以及進行旺盛合成作用的器官(造血器官、胰臟和其他腺體組織)都含有極豐富的核蛋白。一些最簡單的生命形態如病毒, 就是核蛋白。

核蛋白由高分子的核酸和簡單蛋白質(往往是精蛋白和組蛋白)組成。按照組成成分的不同, 核酸可分為脫氧核糖核酸和核糖核酸, 前者集中在細胞核中, 後者則分布在細胞質和核仁中。

核酸分子是由許多單核苷酸以3'—5'磷酸二酯鍵連接起來的

多核苷酸鏈。每个单核苷酸又由碱基(嘌呤和嘧啶)、戊糖(核糖或脱氧核糖)和磷酸組成。核酸的部分結構可用下式表示。



实验十八 肝臟核蛋白的分离提取 和核酸成分的鉴定

pH 和 NaCl 浓度对于核蛋白的溶解度有很大影响。RNA 蛋白在微酸或微碱的 0.14 M NaCl 溶液中的溶解度較高，在其等电点 (pH4.5)时，其溶解度則显著地降低。DNA 蛋白在 0.14 M NaCl 的溶解度仅为水溶液中溶解度的 1%，但在 1 M NaCl 溶液中，其溶解度可达水中溶解度的两倍。利用 RNA 蛋白和 DNA 蛋白的溶解度上的差异，我們可以分別提取这两类核蛋白。为了尽量避免核蛋白的变性和降解，应在低温下进行分离提取。并于 NaCl 溶液中加入 0.01 M 檸檬酸鈉以抑制脱氧核糖核酸酶的作用。有关核蛋白和核酸的分离提取可参阅参考书目^(34,35)。

稀酸可以催化核蛋白水解成核酸和蛋白质，还可以催化核酸和蛋白质水解生成它們的組成成分。

器材 (1) 离心管；(2) 試管及試管架；(3) 水浴鍋；(4) 研鉢或玻璃手匀浆器；(5) 漏斗；(6) 离心机；(7) 台秤。

試劑 (1)0.14M NaCl 溶液(含有 0.01M 檸檬酸鈉); (2) 1.0M NaCl 溶液; (3) 1N 盐酸; (4) 0.4% NaOH; (5) 双縮脲試劑^[27]; (6) 10% 硫酸; (7) 濃氨水; (8) 0.1N 硝酸銀溶液; (9) 10% 硝酸; (10) 3N 鉑酸銨; (11) Bial 氏試劑^[4]; (12) 二苯胺試劑^[28]; (13) 10% 醋酸; (14) 10% 硫酸鈉; (15) 鮑和亞硫酸氫鈉溶液。

操作 称取動物(大鼠或家兔)新鮮肝組織約 2 克, 放入冰浴中的小研鉢中研磨成漿。加入 3 毫升冰冷的含有 0.01 M 檸檬酸鈉的 0.14 M NaCl^①, 繼續研磨 3—5 分鐘^②。將勻漿傾入 15 毫升離心管中, 并用 5 毫升含 0.01 M 檸檬酸鈉的 0.14 M NaCl 沖洗乳鉢。洗液一并倒入離心管中。用玻棒緩慢攪拌 3—5 分鐘後, 离心(2000—3000 轉/分)5—10 分鐘。保留勻漿殘渣作 DNA 蛋白提取實驗。將上清液倒入另一離心管中, 滴加 1N 盐酸調上清液 pH 到 4.5。放入冰浴中使 RNA 蛋白慢慢沉淀出來。放在冰水浴中 15—30 分鐘後, 离心, 弃去上清液。保留 RNA 蛋白沉淀作水解實驗(為了制純, 可再一次溶于 0.14 M NaCl、調 pH 沉淀)。在此 15—30 分鐘時間內, 進行以下 DNA 蛋白提取實驗。

向保留的勻漿殘渣加 2 毫升 1 M NaCl。用玻棒攪勻後, 移入小乳鉢中。用力研磨 5—10 分鐘(可加些細玻璃砂)。再加 5 毫升 1 M NaCl 繼續用力研磨 3—5 分鐘^②。轉入離心管。混勻後, 离心(2000—3000 轉/分)10 分鐘。弃去殘渣, 將上清液傾入小燒杯中, 沿杯壁慢慢加入 6 倍體積的冰水。用細玻璃棒慢慢攪拌溶液, 即有纖維狀 DNA 蛋白沉淀析出。傾弃大部分上清液, 然後离心得

① 提取核蛋白用的 NaCl 溶液和沖稀用的蒸餾水都應該是冰冷的, 否則, 得不到高分子纖維狀的 DNA 蛋白。

② 第一次研磨只為了打破細胞膜以便提取出核糖核蛋白, 不要磨得過細。第二次研磨殘渣是为了分离脱氧核糖核蛋白, 要打破核膜, 因此須用力仔細研磨。否則, 不能提出。

DNA 蛋白质沉淀^①。

使用以上制得的 RNA 蛋白和 DNA 蛋白分别作以下实验。

用 2 毫升 0.4% NaOH 溶液溶解 RNA 蛋白沉淀。取 0.5 毫升作双缩脲反应。向其余 1.5 毫升加入 6 毫升 10% H₂SO₄，并在沸水浴中加热水解 15—30 分钟。过滤。取滤液进行以下实验。

取 1 毫升滤液，加氨水使成碱性反应。再加入 0.1N AgNO₃ 溶液约 1 毫升。放置片刻，观察有无白色嘌呤碱基的银化合物沉出。

碱基测定亦可按下列方法进行。取滤液 2 毫升，用 10% 醋酸酸化溶液后煮沸并过滤。在滤液中加入 1 毫升 10% CuSO₄ 和 0.5 毫升饱和亚硫酸氢钠溶液。再加热。如有嘌呤碱基存在，则溶液呈黄绿色，即腺嘌呤和鸟嘌呤的铜化合物的颜色。放置后，溶液变混浊。

另取滤液 2 毫升，先加入氨水使成微碱性反应，再加入 10% HNO₃ 使成酸性反应。加入 1 毫升 3N 钼酸铵溶液后，在沸水浴中加热。观察有无黄色磷钼酸铵沉淀。

另取 1 毫升滤液 2 份，分别加入等体积的地衣酚试剂和二苯胺试剂。在沸水浴中加热 10—15 分钟。比较并解释颜色变化。

向 DNA 蛋白沉淀中加入 1 毫升 1M NaCl 溶液，令其溶解。加入 1 毫升二苯胺试剂后，在沸冰浴中加热 10—15 分钟。观察颜色变化^②。

实验十九 脾臟脱氧核糖核蛋白的提取和鉴定

器材 (1) 小乳鉢; (2) 玻璃粉; (3) 离心机; (4) 試管; (5) 100 毫

① 加入蒸馏水时要沿壁慢加。如猛然倒入，会把 DNA 蛋白纤维冲散。纤维状 DNA 蛋白可以用玻璃棒逐渐团绕起来，不必离心。

② 因为 DNA 蛋白较少，所以不用作水解。若量较多，也可与 RNA 蛋白一样水解。

升燒杯；(6)量筒；(7)水浴鍋。

試劑 (1)5% NaCl 溶液；(2)0.4% NaOH 溶液；(3)1% 二苯胺試劑^[28]。

操作 將動物(大鼠或家兔)杀死，迅速取出脾臟并用冰冷却。称取約 0.5 克脾組織，置于用碎冰圍繞的小乳鉢中。加 0.5 克玻璃粉或河砂，共同研磨。逐漸分次加入 15 毫升冰冷的 5% NaCl 溶液，隨加隨磨。加完后，繼續研磨 10—15 分钟。傾入離心管內，離心 15 分钟(4000 轉/分)。將離心液傾入盛有 80—90 毫升冰冷蒸餾水的燒杯內。脫氧核糖核蛋白呈纖維狀沉淀析出。以玻璃棒攪拌懸浮液，使核蛋白纏繞在棒上。以上操作均在 0°C 左右進行。將纖維狀核蛋白小心取出，溶于 1—2 毫升 0.4% NaOH 溶液中。取 1 毫升溶液，加等體積二苯胺試劑，在沸水浴上加熱 10 分钟。觀察出現的藍色。

實驗二十 酵母核糖核蛋白的水解 及核糖核酸成分的鑑定

酵母細胞中含有丰富的核糖核蛋白。

(A)用 5% 硫酸煮沸时，可部分地水解酵母的核蛋白，生成磷酸、戊糖、碱基和简单蛋白质。简单蛋白质也发生部分水解。

器材 (1)250 毫升燒瓶；(2)40 厘米長的迴流冷凝器(或以長玻璃管代替)；(3)漏斗；(4)試管及試管架。

試劑 (1)干酵母；(2)5% 硫酸；(3)10% 氢氧化鈉溶液；(4)Benedict 氏試劑^[6]；(5)1% 硫酸銅溶液；(6)15% 氨水；(7)濃氨水；(8)鉬酸銨溶液^[29]；(9)10% 硝酸；(10)0.1N 硝酸銀溶液；(11)Tollen 氏試劑^[3]；(12)濃硝酸；(13)10% 三氯醋酸。

操作 把約 5 克酵母稱入 250 毫升燒瓶內，添加 5% 硫酸 30—40 毫升。裝上迴流冷凝器，煮沸內容物 1 小時。冷后，每 10 毫

升水解液加入 4 毫升 10% 三氯醋酸，以沉淀蛋白质。过滤。用 10% NaOH 中和。用滤液分别进行下列試驗。

(1) 还原糖試驗：取滤液 1 毫升，以 10% 氢氧化鈉进行中和，加 1 毫升 Benedict 氏試劑。搖勻后，加热。觀察結果。另用 Tollen 氏試劑证明此还原糖为戊糖。

(2) 磷酸試驗：取滤液 2 毫升，先加 15% 氨水致弱碱性反应，再加 10% 硝酸到酸性反应。最后加鉬酸銨溶液約 1 毫升。加热。注意有无黃色磷鉬酸銨沉淀。

(3) 嘧吟碱基試驗：取滤液 2 毫升，加濃氨水至碱性反应。过濾。向滤液中加入 0.1N 硝酸銀溶液約 1 毫升。放置片刻，观察有无白色嘌呤碱基的銀化合物沉淀。

(B) 酵母細胞中的核糖核酸蛋白也可用 0.4% NaOH 溶液提取，并在 pH4—5 时沉淀析出。

器材 (1) 研鉢；(2) 燒瓶；(3) 錐形瓶；(4) 試管和試管架。

試剤 (1) 干酵母；(2) 乙醚；(3) 0.4% NaOH 溶液；(4) 10% HCl；(5) 5% H₂SO₄；(6) Benedict 氏試劑^[63]；(7) Tollen 氏試劑^[63]；(8) 濃氨水；(9) 濃 HNO₃；(10) 3N 鉬酸銨；(11) 5% AgNO₃。

操作 取 20 克干酵母，加 5 克細砂、5 毫升乙醚、5 毫升水。在研鉢中充分研磨。在研磨时不断加入少量水，使最終成为浆状液。将此浆状液轉移到带塞的玻璃錐形瓶中，并用 0.4% NaOH 冲洗研鉢。再加 0.4% NaOH 到 100 毫升左右。加入 3 毫升甲苯，蓋上蓋子，放置 24 小时或更长，并时常振动。过滤。弃去残渣，在滤液中滴加 10% HCl，調 pH 在 4—5 之間，放置，使核蛋白沉淀。倒去上清液。将沉淀轉入燒瓶中，加 50 毫升 5% H₂SO₄，在水浴中加热 1 小时，并不断加水保持原体积。过滤。用滤液按照上边的方法进行：(1) 还原糖和戊糖試驗；(2) 磷酸試驗；(3) 嘧吟碱基試驗。

实验二十一 用定磷法测定组织中的 RNA 和 DNA

核酸是一类复杂的化合物，在稀碱或酶的作用下，分解成为单核苷酸。单核苷酸可进一步水解成磷酸、戊糖（D-核糖或 D-2-脱氧核糖）和嘌呤或嘧啶类化合物。根据其糖的成分，可将核酸分为核糖核酸（RNA）和脱氧核糖核酸（DNA）。

根据 Schmidt 和 Thannhauser 法⁽³⁶⁾，由组织中，将能溶于酸的无机磷和磷脂除去后，剩余的含磷化合物为核酸和磷蛋白。在室温下，以 1N 氢氧化钠或氢氧化钾水解 16 小时，DNA 保持其不溶于酸的性质，RNA 分解成可溶于酸的单核苷酸，而磷蛋白的磷则完全变成无机磷。分别测定这三种形式的磷即可算出组织中 DNA 和 RNA 的含量。

器材 (1)50 或 100 毫升量筒 1 个；(2)10 毫升吸量管 1 个；(3)5 毫升吸量管 2 个；(4)1 毫升吸量管 2 个；(5)小研钵 1 个；(6)离心管 2 个；(7)离心机 (4000 转/分)；(8)干燥器。

試劑 (1)7% 三氯醋酸；(2)1% 三氯醋酸；(3)酒精；(4)乙醚；(5)甲醇；(6)氯仿；(7)1N NaOH 或 KOH；(8)6N HCl。

操作 准确称取肝组织或其他组织约 2 克，放在在碎冰上的乳钵内，与 20 份（体积）冰冷的 7% 三氯醋酸溶液磨成匀浆（约 10 分钟）。离心，倾出上层清液。用冷的 1% 三氯醋酸洗涤沉淀物 2—3 次，直到洗涤液中不含无机磷为止（用 α -1, 2, 4 氨基萘酚 磷酸检查）。此后用酒精和乙醚連續洗涤各二次，将沉淀悬浮在 30—40 倍（组织湿重）酒精-乙醚混合液 (3:1V/V) 中，在水浴上迴流 10 分钟。离心，并用乙醚洗涤沉淀。将干的沉淀再与 30—40 倍体积甲醇和氯仿混和液在水浴上煮沸迴流 30 分钟。将沉淀物离心，用乙醚洗涤。最后，在盛有石蜡碎片的干燥器中干燥，直到除去乙醚。

将干燥的粉末置于 10 毫升 1 N 氢氧化钠溶液中，在室温下不断振荡 16 小时。碱水解毕，离心除去不溶性物质。取出一定量上层清液(1—2 毫升)，测定其中 RNA、DNA 和磷蛋白的总磷量(P_1)。另取出 5 毫升清液，加入 1 毫升 6 N NaCl 和 5 毫升冰冷的 7% 三氯醋酸。在此情况下，脱氧核糖核酸被沉淀，而核糖核酸水解生成的单核苷酸和磷蛋白水解生成的无机磷定量地留于清液中。取出一定量的(1—2 毫升)上层清液，测定 RNA 和磷蛋白的总磷量(P_2)和来自磷蛋白的无机磷含量(P_3)。磷蛋白的磷一般很少，甚至没有。

$$\text{计算} \quad \text{核酸总磷量} = P_1 - P_3;$$

$$\text{核糖核酸含磷量} = P_2 - P_3;$$

$$\text{脱氧核糖核酸含磷量} = (P_1 - P_3) - (P_2 - P_3) = (P_1 - P_2).$$

核糖核酸含磷量为 9.5%，脱氧核糖核酸含磷量为 9.84%。将所得核糖核酸和脱氧核糖核酸磷量分别乘以系数 10.5 和 10.1，即得核糖核酸和脱氧核糖核酸的含量。

各种含磷化合物的测定方法

测定各种含磷有机化合物的方法经常是先把这些有机化合物水解放出无机磷，然后测定无机磷。不同含磷有机化合物的水解条件不同。

最通用的测定磷酸的方法是各种比色法。磷酸和钼酸铵反应生成磷钼酸。磷钼酸被还原时，产生钼蓝。测定钼蓝颜色的强度来计算磷酸含量的方法，为这些方法的一种。Fiske-Subbarow⁽³⁷⁾用 α -1, 2, 4 氨基苯酚磷酸作为还原剂。

1. 无机磷的测定法

无机磷的测定，可以直接在溶液内进行，或者用镁盐沉淀出来以后进行。

无机磷很少时(如无蛋白滤液),不易沉淀,可以直接取原有溶液,进行测定。

器材 (1)試管; (2) 1 毫升吸量管 2 个; (3) 2 毫升吸量管 2 个; (4) 5 毫升吸量管 2 个; (5)恒溫水浴鍋。

試剂 (1) 5N 硫酸溶液; (2) 2.5% 鉑酸銨溶液; (3) α -1, 2, 4 氨基萘酚磷酸溶液^[30]; (4)标准磷酸盐 (KH_2PO_4) 溶液(每毫升含磷 0.05 毫克加入 1—2 滴氯仿防腐)。

操作 取 3 支試管, 分別标号。在第 1 支試管內, 加入无蛋白滤液 1 毫升, 第 2 支試管內, 加入标准磷酸盐溶液 1 毫升, 第 3 支試管內, 加蒸餾水 1 毫升作为空白对照。然后各加 2.5 毫升鉑酸銨-硫酸混合液(由等体积 2.5% 鉑酸銨溶液及 5 N 硫酸配成) 及 1:4 稀釋的 α -1, 2, 4 氨基萘酚磷酸溶液 0.5 毫升。用水稀釋到 10 毫升。混勻并放在 37°C 恒溫箱內保溫 10 分钟。冷后, 进行比色。

2. 总磷量的測定法

先用濃硫酸消化无蛋白滤液, 将有机磷变为无机磷后, 再行测定。

器材 (1)测无机磷所用之器材; (2)100 毫升凱氏燒瓶 3 个; (3)10% NaOH 溶液; (4) 30% 过氧化氢; (5)酚酞——溶于 60% 酒精的 0.5% 溶液。

有机磷的无机化: 取 1 毫升无蛋白滤液, 放入小凱氏燒瓶內。加入 2 毫升 5 N 硫酸后在电炉上加热。当所有水分被蒸发后, 将燒瓶略为冷却, 然后加 1—2 滴 30% 过氧化氢溶液。过氧化氢須直接加入溶液中, 不可滴在燒瓶的壁上。重新加热 10 分钟。如果溶液仍为棕色, 可再加 1—2 滴过氧化氢溶液, 继續加热。如果加过氧化氢 10 分钟后, 溶液已透明无色, 证明消化已完全。冷却后, 加 2—3 毫升水, 再煮約 10 分钟, 使焦磷酸水解。将溶液傾入 10 毫升(或

25毫升)容量瓶內(或刻度試管)。用蒸餾水沖洗燒瓶，并將洗液一并加入量瓶內。混合後，用酚酞作指示劑加碱中和，最後，加水至刻度。

磷的比色測定：取出1—2毫升溶液，加2.5毫升鉬酸銨混合液及0.5毫升 α -1,2,4氨基苯酚磷酸溶液。用水稀釋至10毫升。在37°C下保溫10分鐘，然後比色。每次都用標準磷樣品作為比色的標準，並作空白對照。

参考書目

- (1) Schiff, H., Ber., 29, 298 (1896).
- (2) Masaji Tomita, H. S., Z. physiol. Chem., 201, 38 (1931).
- (3) Millon, E., Compt. Rend., 28, 40 (1849).
- (4) Arnow, L. E., J. Biol. Chem., 118, 531 (1937).
- (5) Salkowski, E., Z. physiol. Chem., 12, 215 (1888).
- (6) Koch, F. C and Hanke, M. E., Practical Methods in Biochemistry, 6th Ed., p. 49 (1953).
- (7) Johnson, T. B. and Kohman, E. F., J. Am. Chem. Soc., 37, 1863, 2170, 2598 (1915); 38, 1392 (1916).
- (8) Adamkiewicz, A., Arch. Geo. Physiol., 9, 156 (1874).
- (9) Hopkins, F. G. and Cole, S. W., J. Physiol., 27, 418 (1902).
- (10) Acree, S. F., J. Biol. Chem., 2, 145 (1906).
- (11) Rosenheim, O., Biochem. J., 1, 233 (1906).
- (12) 霍克等著，实用生物化学，中山医学院生化教研室譯，94頁 (1961)。
- (13) Winkler, S., Z. physiol. Chem., 228, 50 (1934).
- (14) Harvey, D. G., Miller, E. T. and Robson, W., J. Chem. Soc., 153 (1941).
- (15) Kappeller-Adler, R., Biochem. Z., 264, 131 (1933).
- (16) Sakaguchi, S., J. Biochem. (Japan), 4, 24 (1925).
- (17) Rapoport, S. M. und Raderecht, H. J., Physiologisch-Chemisches Praktikum, p. 133, Veß verlag Technik, (1956).

- (18) Robert, B. J., Laboratory Manual for Biochemistry, p. 43 (1958).
- (19) Dubnoff, J. W., J. Biol. Chem., **141**, 710(1941).
Kossell, B. et al., J. Biol. Chem., **145**, 359(1942).
- (20) 如(17)p. 128.
- (21) Ruhemann, S., J. Chem. Soc., **97**, 2025(1910).
- (22) Ruhemann, S., J. Chem. Soc., **99**, 1486(1911).
- (23) Yemm, E. W. and Cocking, E. C., The Analyst, **80**, 209(1955).
- (24) Slyke, D. D. van, et al., J. Biol. Chem., **141**, 627(1941).
- (25) Grassmann, W. and van Arnin, K., Annalen, **509**, 288(1934);
519, 92(1935).
- (26) Sörensen, S. P. L., Biochem. Z., **7**, 45(1907).
- (27) Clark, W. M., Topics in Physical Chemistry, p. 309(1952).
- (28) French, D. and Edsall, J. T., Advances in Protein Chemistry, Vol. II, p. 278(1945).
- (29) Smith E. L. and Davis, N. C., Methods of Biochemical Analysis, Vol. II, p. 215(1954).
- (30) Kjeldahl, J., Z. Anal. Chem., **22**, 366(1883).
- (31) 有关凯氏定氮法的综合性文章:
1) Bradstreet, R. B., "A Review of the Kjeldahl Determination of Organic Nitrogen", Chem. Rev., **27**, 331(1940).
2) Ma, J. S. and Znazaga, G., "Micro-Kjeldahl Determination of Nitrogen", Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **14**, 280(1940).
3) Kirk, P. L., "Kjeldahl Methods for Total Nitrogen", Anal. Chem., **22**, 254(1950).
- (32) 关于凯氏定氮法的一些发展:
1) Kirk, P. L., Advances in Protein Chemistry, Vol. III, p. 149 (1947).
2) Kirsten, W., Anal. Chem., **25**, 74(1953).
- (33) 关于凯氏定氮法的具体操作:
1) Pregl, F., Quantitative Organic Microanalysis, 4th Ed., p. 88 (1945).

- 2) 潘家秀等編, 蛋白質化學研究技術, 4—8頁(1962).
- 3) Nieuwenburg, C. J. van and Ligten, J. W. L. van, Quantitative Chemical Micro-Analysis, p. 158(1963).
- (34) Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Methods in Enzymology, Vol. II, Section V (1957).
- (35) Chargaff, E. and Davidson, T. N., The Nucleic Acid, Vol. I(1955); 中譯本: 核酸, 第一卷, 354—457頁(1963).
- (36) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J., J. Biol. Chem., **161**, 83 (1945).
- (37) Fiske, C. H. and Subbarow, Y., J. Biol. Chem., **81**, 629(1929).

第四章 維生素、激素及植物次生物質

(一)維生素是一类具有不同化学結構的有机化合物，为促进动物生长及維持健康所必需；需要量虽然不大，但动物体不能自行合成。在动物机体内，維生素、酶和激素，在高級神經活動影响下，共同控制和調節代謝作用。当机体缺乏某种維生素时，就会发生維生素不足症或缺乏症。

維生素分为两大类：(1)脂溶性維生素，包括維生素A和維生素D等；(2)水溶性維生素，包括維生素B族和維生素C等。

定性鉴定和定量测定維生素的方法有物理方法（如利用吸收光譜）、化学方法（利用各种維生素的特殊化学反应）及生物学方法（利用动物及微生物作實驗材料）。

(二)激素是由人体或动物体内某些組織或器官（內分泌腺）所制造、不經导管而直接进入血液淋巴系統的生物学活性物质。激素的分泌受中樞神經系統直接或間接控制。随血流入机体各部后，它們刺激或抑制整体或某些器官的生理生化活动。

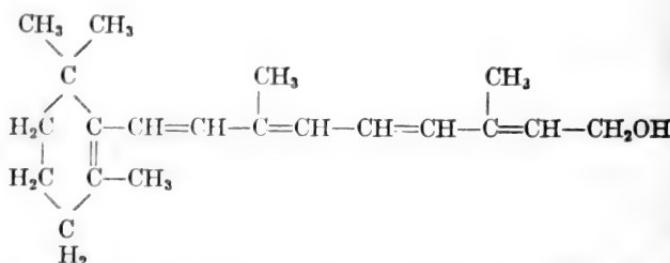
根据化学結構，已知的激素可分为(1)含氮激素，像胰島素和催乳素等；(2)固醇激素，像腎上腺皮质激素和性激素等。

(三)植物次生物質的定义不甚明确，通常是指植物机体内除蛋白质、糖、脂类及維生素等以外的各种有机化合物。植物碱、糖苷、植物激素、抗生素、脂肪族有机酸、鞣质、香精油和橡胶等均屬之。

實驗二十二 維生素A的定性試驗

維生素A（抗干眼病維生素）屬於脂溶性維生素。維生素A₁

結構式如下：



在氯仿溶液中，維生素 A 与三氯化錫生成不稳定的藍色，称为 Carr-Price 反应⁽¹⁾。此呈色反应常用作維生素 A 的定性鉴定，并已发展成維生素 A 的定量測定法^(2,3)。

在本試驗中所使用的器材和試劑必須絕對干燥，微量水分即可使三氯化錫形成氯氧化錫 (SbOCl)，不再与維生素 A 起反应，并引起混浊⁽¹⁾。为了吸收可能混入反应液中的微量水分，可向試管中添加醋酸酐 1—2 滴。

类胡蘿卜素，包括胡蘿卜素和胡蘿卜素的氧化产物，也呈此顏色反应⁽²⁾。此外，某些脂肪含有妨碍維生素 A 和三氯化錫反应的物质。在此情况下，应事先除去妨碍反应的物质⁽³⁾，再进行試驗。有关維生素 A 的測定法，詳見参考书目⁽⁴⁾。

器材 (1)試管及試管架；(2) 2 毫升吸量管。

試剂 (1)魚肝油；(2)精餾氯仿^[31]；(3)溶于氯仿的三氯化錫饱和溶液^[32]；(4)醋酸酐。

操作 取 1—2 滴魚肝油，放入干燥洁淨的試管中，加氯仿約

① $\text{SbCl}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SbOCl} \downarrow + 2\text{HCl}$

② 可以根据生成产物吸收光譜的不同而区分它們。維生素 A₁ 反应产物的最大吸收光譜在 617 毫微米，維生素 A₂ 在 693 毫微米，而 β-胡蘿卜素則在 590 和 1020 毫微米兩处有最大吸收光譜。

③ 可以用皂化法除去脂肪类物质，用层析法除去非維生素 A 和类胡蘿卜素等物质。

0.5 毫升和醋酸酐 1—2 滴。搖勻後，用滴管添加三氯化鎘的氯仿溶液 1—2 毫升，再搖勻。注意觀察藍色的生成和經過土紅色，最後變為褐紫色的變化^①。

實驗二十三 維生素 D 的苯胺試驗

維生素 D（抗佝僂病維生素）為固醇類化合物，易溶於脂肪及脂肪溶劑，不溶於水，對熱比較穩定。至今已知維生素 D 有 5 種，多存於奶油、卵黃等食物中，魚肝油中含量更多。

維生素 D 與 $SbCl_3$ 反應呈現深黃色^(5,6)，並在 500 毫微米處有最大吸收光譜。靈敏度達 0.2γ 維生素 D₂。維生素 D 與 2-氯乙醇和乙酰氯氯仿溶液反應(Sobel 等⁽⁷⁾)形成比 $SbCl_3$ 反應更穩定和特異綠色，在 625 毫微米有吸收光譜。維生素 D 還能與苯胺鹽酸反應形成深紅色產物。測定維生素 D 的化學的和物理學的方法還不能完全代替生物學方法，因為最豐富的材料中維生素 D 的含量也很少，而一些干擾物質的含量卻比較高。在使用鼠和雞作實驗動物的生物學方法中，幾百萬分之一的維生素 D 就能產生明顯效應。Sobel 等⁽⁸⁾評述過測定維生素 D 的各種方法。

器材 試管及試管架。

試劑 (1)魚肝油；(2)苯胺-濃鹽酸混合液(15:1)。

操作 向試管內加入魚肝油約 1 毫升，苯胺-濃鹽酸混合液約 3 毫升。充分搖勻，煮沸半分鐘。黃色乳濁液便先轉變成綠色(有時不明顯)，再轉變成紅色。不久，乳濁液分成兩層，下層為深紅色。

實驗二十四 維生素 B₁ 的顏色反應

維生素 B₁（抗神經炎維生素）屬於水溶性維生素。因含有硫

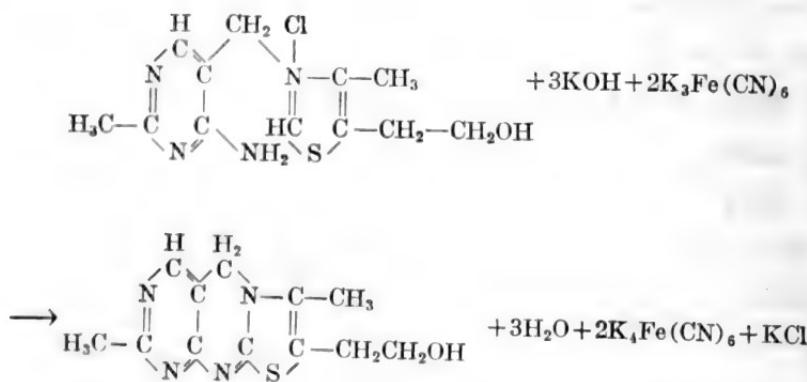
① 顏色變化較迅速，應及時觀察。

及氨基，又名硫胺素。它在植物性食物中分布极广，谷类种子表层中含量更为丰富。麦肤、米糠和酵母均为維生素 B₁的良好来源。維生素 B₁ 的化学测定法主要有下列两种。

(一)重氮苯磺酸反应：此反应最先为 Pauly 在 1904 年提出⁽⁹⁾。經過一系列的爭論，最后为 Kinnersley 和 Peters 所确定⁽¹⁰⁾，并得到发展⁽¹¹⁻¹³⁾。在有碳酸氢鈉存在情况下，硫胺素能与重氮苯磺酸作用产生紅色。加入少量甲醛可使紅色稳定⁽¹³⁾。本反应不很灵敏，特异性也低。因为操作简单迅速，往往用来檢查尿中的維生素 B₁⁽¹⁴⁾。

(二)螢光反应：硫胺素經輕微氧化作用后，即生成黃色而带有藍色螢光的胱氨酸硫胺素(硫色素、硫胺螢)⁽¹⁾。溶于异丁醇中的胱氨酸硫胺素显示的深藍色螢光，在紫外光下更为显著。此反应很灵敏并有高度特异性⁽²⁾，可用以定性或定量測定硫胺素⁽¹⁵⁾。

在碱性环境中，K₃Fe(CN)₆ 可定量地将維生素 B₁ 氧化成硫色素。



① 与蛋白质结合的硫胺素也能形成硫色素，但不能用异丁醇提取。因此，要測定結合形式的硫胺素时，必須先用磷酸酶或硫酸水解，使其从蛋白质中釋放出来。

② 螢光法灵敏度极高，可測出 0.01γ 維生素 B₁。

還有其他一些反應可以用来測定維生素 B₁。Schultz 等利用游離硫胺素能促進酵母發酵這一性質作硫胺素的微量測定。在生物體中硫胺素大部分以輔羧化酶（焦磷酸硫胺素）形式存在。因此，測定此輔酶的活性作為定量測定硫胺素的方法有重要意義。根據 Westenbrinck 拟定的微量方法，可以測定 0.00005γ 輔羧化酶⁽¹⁶⁾。關於硫胺素測定法的評述，可參閱參考書目⁽¹⁷⁾。

器材 (1)試管及試管架；(2)小漏斗；(3)10 毫升量筒；(4)2 毫升吸量管；(5)1 毫升吸量管。

試劑 (1)米糠；(2)0.1N 硫酸；(3)重氮試劑^[33]；(4)碳酸氫鈉碱性溶液^[34]；(5)0.2% 硫胺素溶液；(6)1% K₃Fe(CN)₆ 溶液；(7)30% 氢氧化鈉溶液；(8)異丁醇。

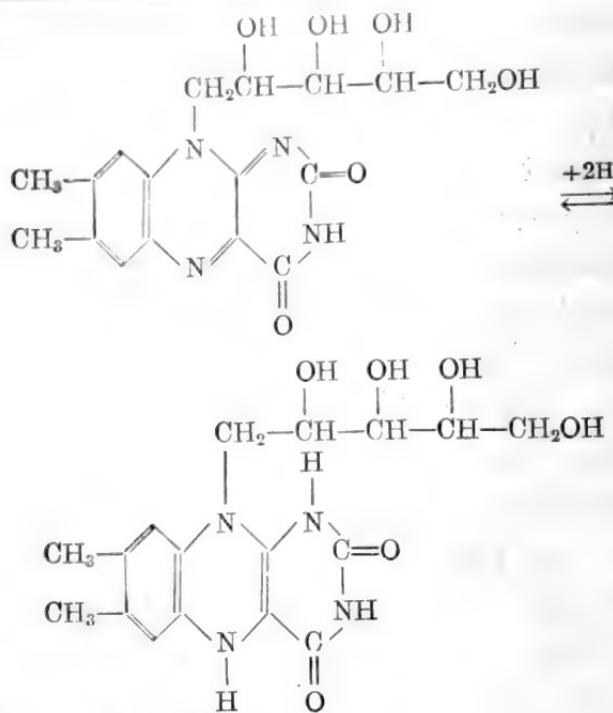
操作 (1)重氮苯磺酸反應：取米糠約 1 克，置試管中。加入 0.1N 硫酸 5 毫升，並用力振蕩，以提取硫胺素。放置 10 分鐘後，用濾紙過濾。取濾液 1 毫升，加入碳酸氫鈉碱性溶液 1.5 毫升及重氮試劑 1 毫升。搖勻後，在 10 分鐘內觀察深紅色的出現。

(2)螢光反應：取 0.2% 硫胺素溶液 1—2 毫升，加入 K₃Fe(CN)₆ 溶液 2 毫升及 30% 氢氧化鈉溶液 1 毫升。充分混勻後，再加入 2 毫升異丁醇，好好振蕩。俟兩液相分開後，觀察上層異丁醇溶液中的藍色螢光^①。

實驗二十五 維生素 B₂ 的定性試驗

維生素 B₂ 的水及酒精中性溶液為黃色，並具有很強的螢光。這種螢光在強酸和強鹼中易破壞。維生素 B₂ 可被亞硫酸鹽還原成無色二氫化物，失去螢光。二氫化物在空气中易重新被氧化，恢復其螢光。其反應如下。

① 觀察時，不要對着陽光，而要由光入射方向觀察。在紫外光下則螢光更加明顯。



器材 試管及試管架。

試劑 (1)核黃素溶液(30微克/1毫升); (2) 2.5% NaHSO₃ 溶液(用2% Na₂CO₃作溶劑)。

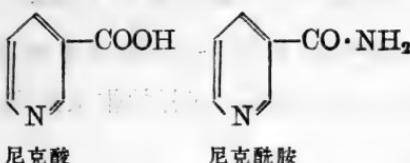
操作 取兩支試管，各加入核黃素溶液1毫升，觀察其黃綠色螢光。在一管中加入5—10滴亞硫酸氫鈉溶液，比較兩管螢光。充分搖動後，再隨時比較兩管螢光。最好在紫外光燈下觀察。

實驗二十六 尼克酸的定性試驗

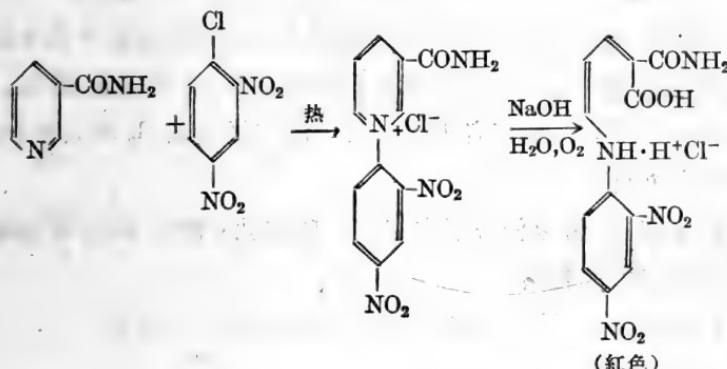
尼克酸又稱為烟酸，與尼克酰胺同為抗癞皮病維生素(或稱維生素PP)。尼克酸在機體內可轉變成尼克酰胺，後者是輔酶I及輔酶II的組成成分。

尼克酸為白色結晶物質，易溶於水及乙醇。用酸水解尼克酰

胺可得尼克酸。



在碱性环境中尼克酸或尼克酰胺与 2,4-二硝基氯化苯结合，产生紅色物质。其反应机制可能如下：



器材 (1)試管及試管架；(2)小蒸发皿；(3)水浴鍋；(4)玻璃棒。

試劑 (1)尼克酸提取液^[35]；(2)1%尼克酸溶液；(3)1%2,4-二硝基氯化苯酒精溶液；(4)1%氢氧化鈉酒精溶液。

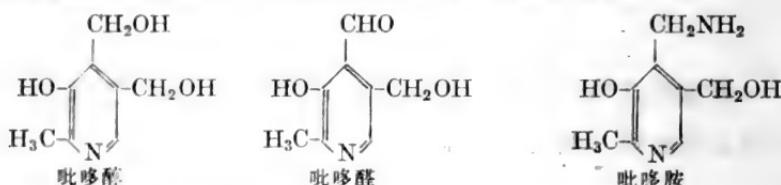
操作 傾注2毫升1%尼克酸溶液于小蒸发皿中，置水浴上蒸干。加入1%2,4-二硝基氯化苯溶液2毫升，用玻璃棒使蒸发皿中干燥物与試剂混匀，再在水浴上蒸干，并繼續加热10分钟。冷至室溫后，加入1%氢氧化鈉酒精溶液1毫升。顏色变紅。

用尼克酸提取液重复上述实验。

尼克酸与硫氰化溴(BrCNS)发生反应，产生黃色产物⁽¹⁸⁾。根据此顏色反应制訂的定量法⁽¹⁹⁾，应用也很广泛。

實驗二十七 維生素 B₆ 的鑑定

維生素 B₆(吡哆素)是與蛋白質代謝密切相關的維生素。吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺三種物質具有同樣的維生素 B₆ 生理功能。



維生素 B₆ 是吡啶衍生物，含有羥基，在碱性溶液中能與酚試劑起藍色反應⁽²⁰⁾。有人利用此反應作維生素 B₆ 的定量測定。但反應特異性不高，使用者不多。關於測定維生素 B₆ 的其他方法，參閱參考書目⁽²¹⁾。

維生素 B₆ 常以結合形式存在。磷酸吡哆醛為氨基移換酶和氨基酸脫羧酶的輔酶。

維生素 B₆ 易被碱和光破壞，在酸性溶液中較穩定。

器材 (1)試管；(2)漏斗。

試劑 (1)米糠或酵母提取液；(2)0.01% 維生素 B₆ 溶液；(3)濃氨水；(4)Folin 氏酚試劑^[36]；(5)0.1N H₂SO₄。

操作 取約 1 克米糠置試管中，加入 0.1N 硫酸 5 毫升。用力振蕩。10 分鐘後過濾。取 1 毫升濾液，加入濃氨水 1—2 滴及酚試劑 1 滴^①。觀察顏色變化^②。

用維生素 B₆ 溶液重複試驗。

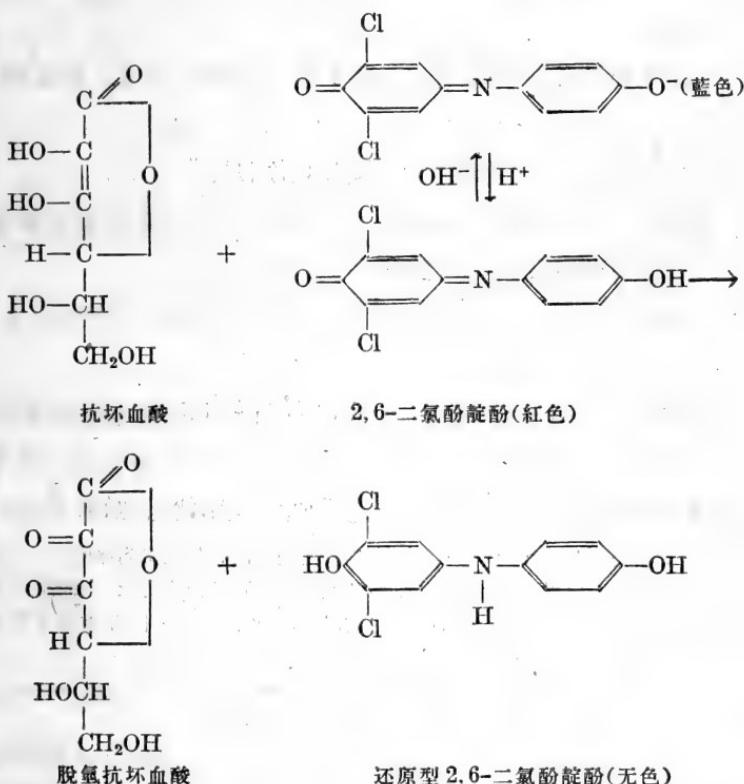
實驗二十八 維生素 C 的定量測定

維生素 C(抗壞血酸)為具有 L-系糖構型的不飽和多羥化合物

① 濃水和酚試劑用量不能過多，否則，出現白色沉淀。

② 提取液中含有其他酚類物質，使顏色過深。

物，屬於水溶性維生素。維生素C首先為A. Szent-Gyorgyi在1928年分離出⁽²²⁾。C. G. King和W. A. Waugh在1932年確定它是抗壞血酸⁽²³⁾。維生素C分布很廣，植物綠色部分及許多水果（橘類、草、山楂、辣椒等）的含量更为丰富。在碱性溶液中加热并有氧化剂存在时，抗壞血酸易被氧化而破坏。在中性和微酸性环境中^①，抗壞血酸能还原2,6-二氯酚靛酚成为无色的还原型2,6-二氯酚靛酚。抗壞血酸本身則被氧化成脫氳抗壞血酸。反应式如下。



① 一般認為，在pH1.0—3.5之間還原反應較特異。Bessey曾提出，pH2.0—3.0是最特異的反應範圍。

利用以上反应，可以定量滴定抗坏血酸^①。从2,6-二氯酚靛酚标准溶液的消耗量，可以計算被檢物质中抗坏血酸含量。使用以上方法測定抗坏血酸，簡便易行，但有下列缺点。

(1)在生物組織內和組織提取物內，抗坏血酸还能以脫氫抗坏血酸及結合抗坏血酸的形式存在。后二者同样地具有維生素C的生理作用，但不能将2,6-二氯酚靛酚还原脱色^②。

(2)生物組織提取物和生物体液中常含有其他还原性物质。在这些物质里，有的也可在同样实验条件下使2,6-二氯酚靛酚还原脱色。

(3)在生物組織提取物中，常有色素类物质存在，滴定終点觀察困难。

关于維生素C定量測定可參閱参考书目^(24,25)。

器材 (1)50毫升錐形瓶；(2)乳鉢；(3)5毫升微量滴定管；(4)10毫升吸量管；(5)量筒；(6)50毫升量瓶。

試剂 (1)松針、橘皮或草莓；(2)1%盐酸；(3)0.001N标准2,6-二氯酚靛酚鈉溶液^[37]。

操作 用分析天平准确地称取松針約0.5克，或橘皮約4克或草莓約2克。样品必須預先用溫水洗去泥土，并在空气中風干。放入乳鉢中，加1%盐酸5—10毫升^③，一起研磨。放置片刻，将提

① 此法是J.Tillmans⁽²⁶⁾在1927年首先提出的。他觀察到檸檬等水果液汁对2,6-二氯酚靛酚有很强烈的还原作用，可以利用这种还原能力的大小来估計水果液汁的抗坏血病活性。后来L.J.Harris及其合作者利用这一作用作为維生素C的定量測定⁽²⁷⁾。

② 有人提出，在测定前用H₂S使脫氫抗坏血酸还原，这样可以测得总抗坏血酸量。但用2,4-二硝基苯肼法⁽²⁸⁾测定总抗坏血酸結果更好。

③ 如何从样品中提取維生素C，一直是研究最多的一个問題。有人使用三氯醋酸、偏磷酸、草酸、盐酸等作为提取剂。偏磷酸和草酸較好，两者都可以結合除去微量Cu⁺⁺和Fe⁺⁺⁺。这两种离子能催化抗坏血酸被氧化。同时，偏磷酸能抑制維生素C氧化酶的酶促氧化作用。Schwarz 和 Guenther⁽²⁹⁾认为，1%盐酸能提出結合型維生素C。在作一般植物样品維生素C的測定时，可以使用盐酸作提取剂。

取液滤入50毫升量瓶。如是反复抽提2—3次。最后用1%盐酸稀释滤液到刻度并混匀。每次量取5或10毫升进行滴定。

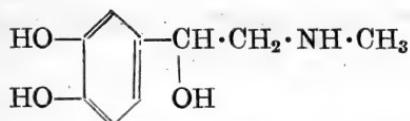
从微量滴定管中，以0.001N 2,6-二氯酚靛酚钠溶液（蓝色）滴定至淡粉红色，并保持半分钟不褪（2,6-二氯酚靛酚在酸性溶液中呈红色）。滴定过程宜迅速，不超过2分钟^①。

要使结果准确，滴定使用的2,6-二氯酚靛酚钠不应少于1毫升或多于4毫升。假如滴定结果在1—4毫升范围以外，则必须增减样品用量或将提取液适当稀释。

另取1% HCl 5或10毫升作对照滴定。

实验二十九 肾上腺素的提取和鉴定

肾上腺素是肾上腺髓质分泌的激素，其化学本质为左旋型甲氨基乙醇邻苯二酚。



肾上腺素为无色结晶，不溶于冷水和一般有机溶剂。但易溶于热水。能与酸结合成盐，市上常见的商品为其盐酸盐。

器材 (1) 試管及試管架；(2) 乳鉢；(3) 細砂子；(4) 50毫升錐形瓶；(5) 25毫升量筒；(6) 水浴鍋。

試劑 (1) 新鮮的猪腎上腺；(2) 0.1N 盐酸；(3) 10% 醋酸；(4) 1% 三氯化铁溶液；(5) 10% 醋酸钠溶液；(6) 0.1% 氯化汞溶液；(7) Ehrlich 氏重氮試剂^[20]；(8) 浓氨水；(9) 0.2% 高硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_8$)溶液。

操作 取新鮮猪腎上腺約2克，置乳鉢中。加入0.1N HCl

① 滴定要迅速。因为在本滴定条件下，一些非維生素C还原物质还原作用較緩。快速滴定可以避免或减少它们的影响。

5毫升和細砂少許，研磨成漿糊狀。移入50毫升錐形瓶中，再加0.1N鹽酸15毫升。在沸水浴中煮5分鐘後，加10%醋酸鈉液7毫升，再煮1分鐘。冷卻後，濾去（或離心除去）殘渣和蛋白質沉淀，用濾液（或上清液）作下列試驗。

(1)Vulpian 氏反應：取濾液2毫升，加10%三氯化鐵溶液2—3滴。溶液呈現綠色。加一滴濃氨水，液体轉變為紅色。這是典型的鄰苯二酚反應。

(2)Comessatti 氏反應：取濾液2毫升，加10%醋酸鈉溶液1毫升和0.1%氯化汞5滴。搖勻後，置水浴中慢慢加熱至40—50°C。觀察玫瑰紅色的形成。

(3)Ehrlich 氏反應：取濾液2毫升，加入等量 Ehrlich 氏重氮試劑。搖勻後，立即加入過量的濃氨水（約5滴）。出現紅色。

(4)Ewins 氏反應：于2毫升濾液中，加入0.2%高硫酸鉀溶液1毫升。在水浴中將溶液徐徐熱至40—50°C。觀察有無紅色出現。

實驗三十 腎上腺素對血糖含量的影響

腎上腺素在糖代謝中所起的作用與胰島素相反，能促進糖元分解成葡萄糖。給機體注射腎上腺素，則可引起高血糖症與糖尿。腎上腺素與胰島素在糖代謝上具有相成相輔的調節作用。

器材 (1)刀片；(2)2或5毫升注射器；(3)0.1毫升微量吸管；(4)小燒杯；(5)5毫升微量滴定管；(6)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的其他器材。

試劑 (1)預先飢餓24小時的家兔；(2)酒精；(3)市售的腎上腺制剂(1:1000)，用0.9%氯化鈉溶液稀釋5倍；(4)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的全部試劑。

操作 称量預先飢餓24小時的家兔體重。按每公斤體重注

射肾上腺素制剂(1:1000)0.37 毫升計算，算出稀釋肾上腺素溶液的注射需要量。

注射前，按照实验三十一的方法取血并测定家兔血糖含量，作为对照。

将事先准备好的肾上腺素溶液，给家兔皮下注射。30分钟后，再由耳静脉取血，进行血糖测定。比较注射前后血糖含量的变化。

实验三十一 胰岛素对血糖含量的影响

胰岛素是胰臟 β -細胞所分泌的一种激素。它的化学本质是蛋白质。在机体内胰岛素具有调节糖代谢的重大作用。它能加速血糖的氧化和促进糖元合成。皮下或静脉注射胰岛素可引起血糖降低。胰岛素缺乏性糖尿病患者糖代谢发生紊乱，血糖升高。注射胰岛素可以校正。

器材 (1)刀片；(2)2 或 5 毫升注射器(注射胰岛素用)；(3)5 或 10 毫升注射器(注射葡萄糖用)；(4)0.1 毫升干燥微量吸管 4 支；(5)50 毫升燒杯；(6)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的其他器材。

試劑 (1)饥饿 24 小时的家兔；(2)酒精；(3)市售胰岛素制剂(1 毫升含有 20 或 40 单位^①)用蒸馏水稀释到每毫升含 1 单位胰岛素；(4)4% 葡萄糖溶液；(5)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的全部試剂。

操作 称量预先饥饿 24 小时家兔的体重。按照每公斤体重

① 胰岛素的生理单位是胰岛素注入事先饥饿 24 小时，体重为 2 公斤的家兔体内时，能引起痉挛(胰岛素性休克)的胰岛素量。此时血中葡萄糖含量可降低到 45 毫克% 左右。

注射 1.5 単位胰島素^①, 算出給家兔注射所需胰島素量。

取 4 个試管, 各加入 0.45% 硫酸鋅溶液 5 毫升和 0.1N 氢氧化鈉溶液 1 毫升。混勻備用。

剃去兔耳部分耳毛, 用酒精浸濕的棉花擦拭。干後, 用刺針或刮臉刀片割破耳靜脈, 迅速用干燥微量吸管吸取 0.1 毫升血液^②。擦掉吸量管尖端外部附着的血液, 立即洗入第 1 號試管中。用另一吸量管同樣吸取 0.1 毫升血液並洗入第 2 號試管中。按 Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法測定血糖。第 3、4 號兩試管為空白對照, 不加血液。

給家兔皮下注射預先準備的胰島素溶液。1 小時後, 再由耳靜脈取血, 同上測定血糖。不用再做空白對照。

為預防胰島素性休克, 第二次取血後, 立即向家兔皮下注射 40% 葡萄糖溶液 10 毫升。

比較注射胰島素前后的家兔血糖含量。

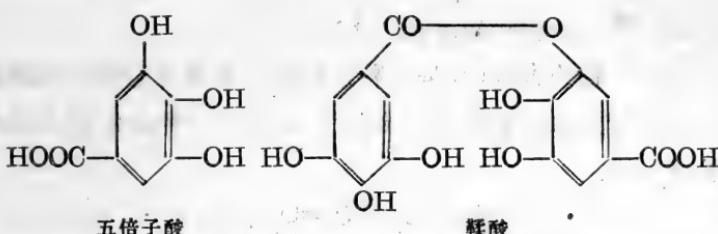
實驗三十二 鞣質的定性反應

鞣質廣泛分布於植物中。石榴皮、茶葉、五倍子(沒食子)等都含有大量鞣質, 五倍子中的含量更為豐富。鞣質能鞣制生毛皮變成熟皮, 鞣質的名稱即由此而來。我們祖先很早就用五倍子鞣革, 至今土法制革中還在使用。

鞣質是一類糖苷, 其中有的是多個鞣酸(單寧酸)分子與一個葡萄糖分子結合而成。鞣酸是二個五倍子酸(或稱沒食子酸)去水縮合產物。

^① 這是能引起家兔痙攣的量的 3 倍。這樣可以很快地引起低血糖。取血後, 立即注射葡萄糖, 以免家兔死亡。

^② 也可用注射器直接穿刺心臟取血。



器材 (1)試管及試管架; (2)100 毫升燒杯; (3)乳鉢; (4)小漏斗。

試劑 (1)五倍子(中药鋪中有售); (2)1% 三氧化鐵溶液; (3)0.1% 奎寧溶液; (4)1% 醋酸鉛溶液; (5)1% 白明胶溶液。

操作 (1)在中性环境中, 鞣质与三价铁盐(三氧化铁、铁氨矾)发生反应, 产生藍色或綠色的化合物。藍色或綠色决定于酚基的数目与位置。

取五倍子約 5 克, 放乳鉢中搗碎后, 移入燒杯中。加水 30 毫升, 煮沸 5 分钟, 过滤。取滤液 2 毫升, 滴加 1% 三氯化鐵 2—3 滴。顏色怎样?

(2)鞣质为一种植物碱試剂, 能使植物碱沉淀。取滤液 2 毫升, 滴加 0.1% 奎寧 3—4 滴。觀察沉淀出現。

(3)鞣质能被重金属盐沉淀。取滤液 2 毫升, 加 1% 醋酸鉛溶液 3—4 滴, 立即有沉淀形成。

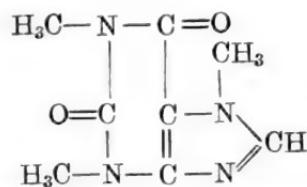
(4)鞣质还能沉淀蛋白质。取 1% 白明胶溶液 2 毫升, 滴加滤液 2—3 滴, 即有沉淀出現。

實驗三十三 茶碱的提取和一些性质

植物碱是一类特殊的碱性含氮有机化合物, 氮常存在于分子的环状结构中。植物碱微溶于水, 但易溶于微酸性溶液, 易溶于乙醇、乙醚、氯仿、苯或石油醚等有机溶剂。鞣酸、磷鉬酸、苦味酸、亚铁氰化鉀或 KI—HgI₂ 等試剂能使植物碱在水溶液中沉淀。因此

这些試劑被称为植物碱試劑。

茶碱又称为咖啡碱，是一种植物碱。茶碱为无色針状結晶，味苦，易溶于热水。它的化学名称为 1,3,7-三甲基 2,6-二氧嘌呤，结构式如下：



干茶叶中含茶碱 3—5%。

器材 (1)試管及試管架；(2)漏斗；(3)小蒸发皿；(4)100 毫升燒杯；(5)尖端較細的滴管；(6)載玻片；(7)顯微鏡。

試劑 (1)茶叶；(2)氯仿；(3)市售茶碱；(4)鞣酸飽和溶液；(5)碘化鉀-碘化汞溶液^[22]。

操作 称取茶叶 2 克，放入燒杯內。加蒸餾水 50 毫升，煮沸 30 分钟。趁热過濾，將濾液倒入蒸发皿中，放在水浴上蒸干。

用氯仿 2 毫升溶解蒸发皿內的干燥物质，并将溶液倒入試管中。用蒸餾水反复洗滌試管中的氯仿溶液，直至把褐色物质洗净为止。用水洗滌时，每次用 2 毫升。每次洗完后，用細尖滴管将水吸出抛弃之。

用滴管把氯仿溶液小心地滴到載玻片上，每滴一滴即用微火烘干。在顯微鏡下觀察茶碱的針狀結晶。

茶碱能升华。取另一玻片放在載有茶碱的玻片的上方，但不接触。用小火微微加热后，就可发现上面的玻璃片有針狀結晶出現。

取 2 支試管，各加茶碱結晶一小粒。于一試管內加氯仿 1 毫升，于另一試管內加冷水 1 毫升。振蕩，觀察溶解現象。将加有冷水的試管加热，有何变化？

另取2支試管，各加入茶碱結晶數粒及蒸餾水2毫升。于一試管內滴加鞣酸飽和溶液，另一試管內滴加碘化鉀-碘化汞溶液各數滴。觀察沉淀的形成。

参考书目

- (1) Carr, F. H. and Price, E. A., Biochem. J., **20**, 498(1926).
- (2) Yudkin, S., Biochém. J., **35**, 551(1941).
- (3) 食物营养成份測定法, 中国医学科学院劳动卫生劳动保护及职业病研究所营养学系編, 46頁(1961).
- (4) Sebrell, W. H. and Harn, R. S., The Vitamins, Vol. I, p. 87(1954).
- (5) Nield, C. H., Russell, W. C. and Zimmerli, A., J. Biol. Chem., **136**, 73(1940); **148**, 245(1943).
- (6) Koch, F. C. and Hanke, M. E., Practical Methods in Biochemistry, 6th Ed., p. 418(1953).
- (7) Sobel, A. E. et al., Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed., **17**, 160(1945).
- (8) Sebrell, W. H. and Harn, R. S., The Vitamins, Vol. II, p. 215(1954).
- (9) Pauly, H., Z. Physiol. Chem., **42**, 508(1904).
- (10) Kinnersley, H. W. and Peters, R. A., Biochem. J., **28**, p. 667 (1934).
- (11) Prebluda, H. T. et al., Science, **84**, 488(1936); J. Biol. Chem., **127**, 495(1939).
- (12) Melnick, D. et al., J. Biol. Chem., **127**, 505, 515, 531(1939).
- (13) Emmett, A. D. et al., J. Biol. Chem., **135**, 131(1940).
- (14) Hochberg, M. and Melnick, D., J. Biol. Chem., **156**, 53(1944).
- (15) Hennessy, D. T., J. Am. Chem. Soc., **61**, 171(1939); Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed., **13**, 216(1941).
- (16) Westenbrinck, H. G. K., Enzymologie, **8**, 97(1940).
- (17) 如(8)Vol. II, p. 448(1954).
- (18) Melnick, D. and Field, H., Jr., J. Biol. Chem., **134**, 1(1940).
- (19) György, D. P. (Editor), Vitamin Methods, Vol. I, p. 217(1950).
- (20) Folin, O. and Denis, W., J. Biol. Chem., **22**, 305(1915).

- (21) 如(17) p. 244.
- (22) Szent-Gyorgyi, A., Biochem. J., **22**, 1387(1928).
- (23) Waugh, W. A. and King, C. G., J. Biol. Chem., **97**, 325(1932).
- (24) 如(4) p. 177.
- (25) 如(19), Vol. I, p. 260—276; Vol. II, p. 671—678(1951)
- (26) Tillmans, J., Z. Untersuch. Lebensm., **54**, 33(1927).
- (27) Harris, L. J. and Ray, S. N., Biochem. J., **27**, 303, 590(1933).
- (28) Roa, T. H. and Kuether, O. A., J. Biol. Chem., **147**, 399(1943).
- (29) Schwarze W. K., and Guanther, E., Biochem. Z., **319**, 139(1948).

第五章 酶

酶(酵素)是生物体中具有催化功能的蛋白质，因此，也叫做生物催化剂。它们能加快反应的进程，但不参加到反应的最终产物。按其催化功能，酶可分为五大类：(1)催化水解作用的酶称为水解酶，如蛋白酶和脂肪酶；(2)催化氧化还原作用的酶称为氧化还原酶，如酪氨酸酶和琥珀酸脱氢酶；(3)催化分子分裂的酶称为分裂酶，如碳酸酐酶；(4)催化分子间基团移换的酶称为移换酶，如氨基移换酶；(5)催化分子异构化的酶称为异构酶和催化分子内基团变位的变位酶，如UDPG异构酶和磷酸葡萄糖变位酶。

一般来说，水解酶是在物理化学性质上与球蛋白相近似的单纯蛋白质，氧化还原酶是结合蛋白质。目前许多酶已能制成晶体。

酶具有高度特异性。温度和pH对酶的活性有显著影响。能使酶活性增加的一些物质称为酶的激动剂，能使酶活性减低的一些物质称为酶的抑制剂。激动剂与抑制剂常表现某种程度的特异性。

物质代谢是生命的基本特征。在机体中不断地进行着的同化作用和异化作用中，有多种不同的化学变化。这些化学变化绝大多数都在酶的影响下进行。工业部门中的食品工业、发酵工业、制药工业、制革和造纸工业等都和酶有密切关系。因此，酶的研究在生物化学中占有极重要的位置。

实验三十四 酶的特异性

与一般催化剂比较，酶具有高度特异性。有时一种酶仅对一个底物起一定的催化作用。特异性较低的酶则能对一类化合物起

催化作用，这些化合物常具有相同的化学键。例如，淀粉酶能催化淀粉水解，但不能催化脂肪水解，而脂肪酶则能催化脂肪水解，而不能催化淀粉水解。虽然这二种酶所催化的都是水解过程，但是它们要求的作用底物不同，水解破裂的化学键也不同。

大多数酶都具有立体化学特异性。精氨酸酶可作为一个例子来说明。这个酶能催化 L-精氨酸成 L-鸟氨酸和尿素，但不能作用于 D-精氨酸。

本实验以唾液酶(含淀粉酶及少量麦芽糖酶)和蔗糖酶对淀粉和蔗糖的作用为例，来说明酶的特异性。

淀粉和蔗糖缺乏自由醛基，无还原性，但在唾液酶的作用下，淀粉很容易水解成有还原性的麦芽糖和一些葡萄糖。在同样情况下，唾液酶不能催化蔗糖的水解。蔗糖酶能催化蔗糖的水解，产生还原性葡萄糖和果糖，但不能催化淀粉的水解。

器材 (1) 試管及試管架；(2) 恒溫水浴鍋。

試剂 (1) 2% 蔗糖溶液；(2) 新配制的、溶于 0.3% 氯化鈉的 1% 淀粉溶液；(3) 稀釋 200 倍之新鮮唾液^①；(4) 蔗糖酶溶液^[38]。

操作 (1) 淀粉酶的特异性：先以 Benedict 氏試劑鑑定蔗糖和淀粉是否含有还原性杂质。

取 2 支試管，各加入 Benedict 氏試劑 2 毫升，再分別加入 1% 淀粉溶液和 2% 蔗糖溶液各 4 滴。混合均匀后，放在沸水浴中煮 2—3 分钟。观察有无紅黃色沉淀产生。純淨的淀粉和蔗糖不呈阳性反应。

取 2 支試管，向一試管中加 1% 淀粉 3 毫升，另一試管中加入 2% 蔗糖溶液 3 毫升。向 2 支試管各添加稀釋 200 倍的新鮮唾液 1 毫升。混匀，放入 37°C 恒溫水浴中。15 分钟后取出，以 Benedict

① 不同人和不同时刻的唾液中淀粉酶的活性不同，差别有时很大。稀釋倍数可以是 100—200 倍。

氏試劑分別檢查二管的內容物，並記錄結果。

(2) 蔗糖酶的特異性：向1支試管中加入1%淀粉溶液3毫升，向另1支試管中加入2%蔗糖溶液3毫升。再向2支試管中分別加入蔗糖酶溶液各約1毫升。搖勻後，放入37°C恒溫水浴中保溫。10分鐘後取出，用Benedict氏試劑檢查2支試管的內容物。記錄並解釋結果^①。

实验三十五 唾液淀粉酶的激动和抑制

酶的活性常受某些物质的影响，有些物质能增高酶的活性，有些物质則能減低酶的活性。前者通常稱為酶的激动剂，后者稱為抑制剂。激动剂與抑制剂影响酶作用的需要量很小，并常具有特异性。

氯化鈉為唾液淀粉酶的激动剂，硫酸銅為其抑制剂。激动剂和抑制剂的作用不是絕對的，有些物质在低濃度時為激动剂，而在高濃度時則為抑制剂。如氯化鈉達到 $\frac{1}{3}$ 飽和度時就可抑制唾液淀粉酶的活性。

器材 (1)試管及試管架；(2)恒溫水浴鍋及溫度計。

試劑 (1)0.1%淀粉溶液；(2)稀釋100—200倍的新鮮唾液；(3)1%氯化鈉溶液；(4)0.1%硫酸銅溶液；(5)碘化鉀-碘溶液^[39]。

操作 取3支試管，各加入3毫升0.1%淀粉溶液和1毫升稀釋唾液。向第1支試管中加入1毫升1%氯化鈉溶液，向第2支試管中加入1毫升0.1%硫酸銅溶液。向第3支試管中加入1毫升蒸餾水作对照。

搖勻各管內容物，一齊放入37°C恒溫水浴中保溫。15分鐘

① 蔗糖酶溶液中有少量还原性杂质。因此，在使用淀粉作底物的試驗中，也呈現輕度Benedict反應。可以使用煮過的蔗糖酶另做一个補充試驗，證明蔗糖酶溶液中含有还原性杂质。

后，取出^①。冷后，分别滴入2—3滴碘化钾-碘溶液。观察比较3支试管颜色的深浅，并解释之。

实验三十六 温度对酶活性的影响

酶的催化作用受温度的影响。酶所催化的化学反应表现有最适温度现象。在最适温度下，酶反应速度最高。较高或较低的温度能使酶反应速度降低。大多数动物酶的最适温度为37—40°C，植物酶的最适温度为50—60°C。

温度对酶催化的化学反应过程具有双重效应。一方面，温度上升可以使反应加快；另一方面，加快酶本身的“热失效”。在实际测定任何一个酶的最适温度时，必须同时注意时间因素，因为在一定温度下，时间越长，温度对酶的破坏越大。

酶对温度的稳定性与其存在形式有关。有些酶的干燥制剂虽加热到100°C，其活性并无明显改变，但在100°C溶液中却很快地完全失去活性。

低温能降低或抑制酶的活性，但不能使酶失去活性。

器材 (1) 试管及试管架；(2) 恒温水浴锅及温度计。

试剂 (1) 新配制的、溶于0.3%氯化钠的0.2%淀粉溶液；(2) 稀释200倍的唾液；(3) 碘化钾-碘溶液^[39]；(4) 1%尿素溶液；(5) 脲酶提取液^[40]；(6) Nessler氏试剂^[41]。

操作 (1) 温度对唾液酶活性的影响：淀粉和可溶性淀粉遇碘呈蓝色。糊精按其分子的大小，遇碘可呈蓝色、紫色、暗褐色和红色。最简单的糊精遇碘不呈现颜色，麦芽糖遇碘也不呈现颜色。在不同温度下，淀粉被唾液酶水解的程度，可由水解混合物遇碘呈现的颜色来判断。

^① 由于酶的活性不同，保温水解最适合的时间不同。根据实验三十四的经验，确定保温时间。一般10—15分钟较适合。

取 3 支試管各加淀粉溶液約 2 毫升。向第 1、第 2 两試管中，各加稀釋唾液 1 毫升，向第 3 号試管中添加煮过的稀釋唾液 1 毫升。搖勻后，将第 1、第 3 两試管放入 37°C 恒溫水浴中，第 2 号試管放入冰水中。20 分钟后取出，用碘化鉀-碘溶液來檢驗淀粉被唾液酶水解的程度。記錄并解釋結果。

(2)溫度对脲酶活性的影响：脲酶催化尿素水解生成 NH₃ 和 CO₂，NH₃ 可与 Nessler 氏試剂結合生成橙紅色化合物。由顏色的深淺，可看出反应的进行程度。

取試管 4 支。在第 1、第 2 和第 3 三个試管中各加脲酶提取液 1 毫升，在第 4 号試管中加預先煮过的脲酶提取液 1 毫升。将第 2 号試管放在冰水里 5 分钟，使其冷却。最后向 4 支試管內各加 1 毫升 1% 尿素溶液。混勻，将第 1 和第 4 两試管放置在室溫下，第 3 号試管放在 50°C 恒溫水浴中，第 2 号試管仍放回冰水中。10 分钟后，取出第 2 和第 3 两管，并用水管流水冲冷至室溫。向 4 个試管中各加 Nessler 試剂 5 滴，并搖勻。觀察比較各試管顏色的深淺。

实验三十七 pH 对酶活性的影响

酶的活性，受环境 pH 的影响极为显著。通常只在一定的 pH 范圍內，酶才表現它的活性。一种酶活性表現最高时的 pH 值为該酶的最适 pH。低于或高于最适 pH 时酶的活性漸次降低。应当指出，酶的最适 pH 受底物性质和緩冲液性质的影响。

图 8 表示唾液淀粉酶活性与 pH 的关系。

不同酶的最适 pH 值不同，但与

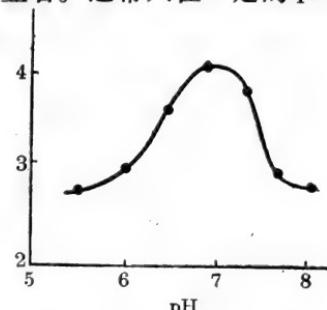


图 8. pH 对唾液淀粉酶活性的影响。

該酶在有机体存在部位的 pH 似有一致关系。例如高等动物的胃蛋白酶最适 pH 为 1.5—2.5, 而胃液的 pH 与此相近。胰蛋白酶的最适 pH 为 8 左右, 而十二指腸附近腸道的 pH 值近乎中性。

本實驗使用唾液淀粉酶來說明 pH 对酶活性的影响。唾液淀粉酶的最适 pH 約為 6.8。有人发现, 在磷酸緩冲溶液中, 其最适 pH 为 6.4—6.6, 而在醋酸緩冲溶液中則为 5.6。

器材 (1)試管及試管架; (2)滴定管; (3)2 毫升和 5 毫升吸量管; (4)50 毫升錐形瓶; (5)恒溫水浴鍋。

試劑 (1)新配制的, 溶于 0.3% NaCl 的 0.5% 淀粉溶液; (2)稀釋 200 倍的新鮮唾液; (3)0.2M 磷酸氫二鈉液; (4)0.1M 檸檬酸溶液; (5)碘化鉀-碘溶液^[39]。

操作 取 8 个标有号碼的 50 毫升錐形瓶。由滴定管按下表比例添加 0.2M 磷酸氫二鈉溶液和 0.1 M 檸檬酸溶液, 制备 pH 5.0—8.0 的 8 种緩冲溶液。

由 8 个錐形瓶中, 各取緩冲液 3 毫升, 分別注入 8 支帶有号碼的試管中。隨后于每个試管中, 添加 0.5% 淀粉溶液 2 毫升和稀釋 200 倍的唾液 2 毫升。(增加一个与 5 号內容相同的試管, 作为檢驗淀粉的水解程度)。向各試管加入稀釋唾液的時間間隔各为 1 分钟。将各試管內容物混勻, 并依次置于 37°C 恒溫水浴中保溫。

10 分钟后(視酶的活性而定, 一般 5—10 分钟), 每隔 1 分钟由第 5 号試管之一, 取出一滴混合液, 置于白磁板上, 加一小滴碘化鉀-碘溶液, 檢驗淀粉的水解程度, 等實驗結果成为橙黃色时(掌握第 5 管的水解程度是本實驗成敗关键之一), 向所有試管依次添加 1—2 滴碘化鉀-碘溶液, 充分混勻。加碘化鉀溶液時間間隔, 由第 1 管起, 也均为 1 分钟。

根据各試管內容物呈現的顏色, 可以看出 pH 对唾液淀粉酶活性的影响。

錐形瓶號碼	0.2M 磷酸氫二鈉(毫升)	0.1M 檸檬酸(毫升)	pH
1	5.15	4.85	5.0
2	6.05	3.95	5.8
3	6.61	3.39	6.2
4	7.28	2.72	6.6
5	7.72	2.28	6.8
6	8.24	1.76	7.0
7	9.08	0.92	7.4
8	9.72	0.28	8.0

實驗三十八 脂肪酶的定性試驗

脂肪酶能催化水解脂肪成甘油与脂肪酸。脂肪酸的生成可用酸碱指示剂来檢驗。

牛乳中的脂肪分散在水相中呈乳状液，容易被脂肪酶水解。本實驗觀察：

(1)胰脂肪酶对牛乳中脂肪的水解作用。

(2)蓖麻子脂肪酶对蓖麻油的水解作用。錳离子对此酶有激活作用。

器材 (1)試管及試管架; (2)10毫升量筒; (3)1毫升和2毫升吸量管; (4)乳鉢及杵; (5)剪刀; (6)恒溫水浴鍋。

試劑 (1)牛乳; (2)新鮮豬(或牛)胰腺; (3)甘油水溶液(1:3); (4)0.1N 氢氧化鈉溶液; (5)1% 酚酞酒精溶液; (6)蓖麻子。

操作 (1)將猪胰用溫水洗淨。剔除脂肪和結締組織后，剪碎。称取碎块約5克，置于乳鉢中。加甘油水溶液10毫升，仔細磨成糊狀。用浸湿的麻布将提取液濾入試管內。

另取2支試管，各加2毫升牛乳和1毫升胰提取液。將一試管煮沸2—3分钟。煮后用自来水冲冷。向2支試管內各加2滴1%

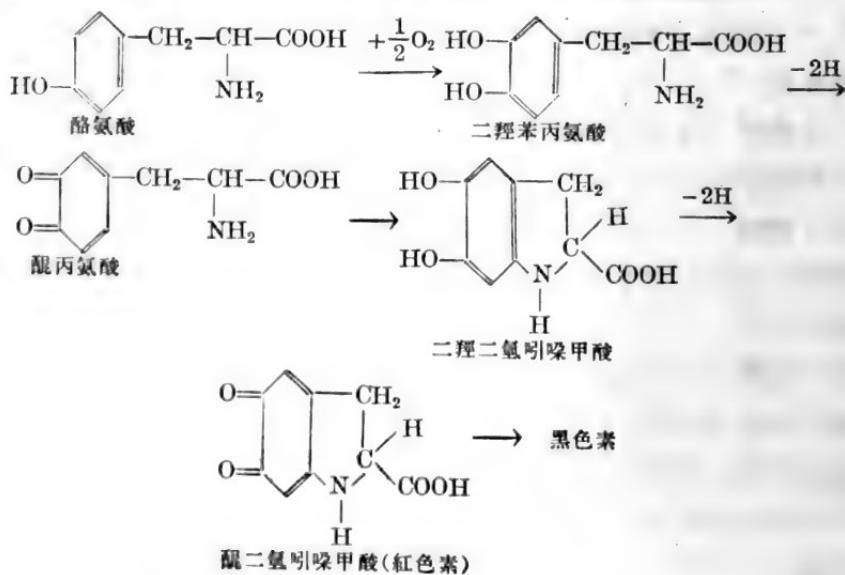
酚酞溶液，并以0.1N 氢氧化鈉溶液中和至呈微紅色（不能過紅）。用木塞塞緊試管，並置于37—40°C 恒溫水浴中保溫半小時。隨時注意試管內顏色的變化，並記錄時間。

(2)取蓖麻子5—10粒,剥去外皮。加5毫升甘油水溶液,仔細磨成糊状。分装入2支試管,将一試管煮沸5分钟,煮后用自来水冲冷。其余操作同前。

实验三十九 氯化酶的定性反应

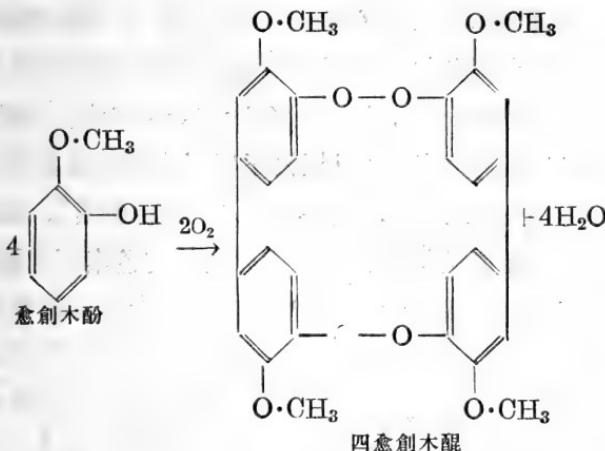
氧化酶能催化分子氧直接氧化底物。酪氨酸酶为生物界分布很广的一种氧化酶, 它催化酪氨酸被氧氧化。在馬鈴薯块莖的外层、甜菜和谷物及真菌中含量都很高。酪氨酸酶特异性不甚严格, 能促进多种单酚及多酚的氧化作用。在弱碱性环境中, 其活性最强。

酪氨酸等酚类衍生物，受酪氨酸酶的催化氧化先形成红色色素，然后继续氧化生成黑色素类物质。一部分反应过程如下：



从紅色素轉变为黑色素不需要酪氨酸酶。在沒有酪氨酸酶存在时，空气中的氧即能导致这样的轉变。

酪氨酸酶能催化愈創木脂中的愈創木酸氧化，生成藍色的臭氧化物。



本實驗利用此顏色反應，作酪氨酸酶的定性鑑定。

器材 (1)試管及試管架；(2)乳鉢及杵；(3)小刀；(4)玻璃漏斗；(5)恒溫水浴鍋。

試劑 (1)生馬鈴薯；(2)溶于0.01N碳酸鈉的0.5%酪氨酸溶液^[42]；(3)愈創木脂酒精溶液^[43]。

操作 (1)取生馬鈴薯約5克，用小刀去皮后切成碎块。放入乳鉢中，加蒸餾水約10毫升，研碎并将提取液过滤。

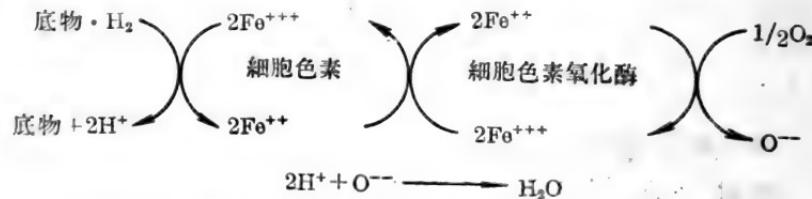
取約3毫升0.5%酪氨酸溶液，傾入試管中，加馬鈴薯提取液約1毫升，振蕩并放入35—40°C之水浴中保溫。时时振蕩，使空氣充分与溶液接触。試管內容物漸漸經過淡紅色、棕紅色、褐色，最后变成黑色(約需1—2小时)。

(2)在生馬鈴薯切片上滴加愈創木脂溶液數滴，觀察藍色出現。在切片邊緣接近表皮處，藍色應較為顯著。用煮熟的馬鈴薯

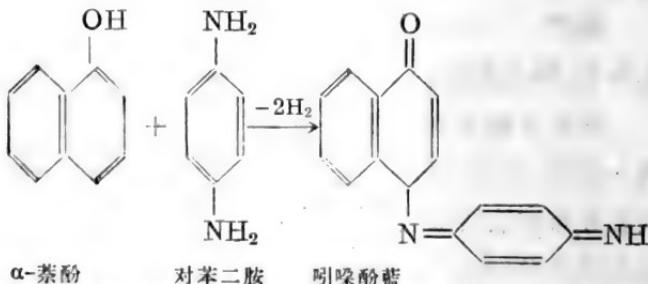
重复以上試驗，并解釋結果。

實驗四十 細胞色素和細胞色素 氧化酶的定性反應

細胞色素氧化酶和細胞色素 *a*、*b* 和 *c* 等是含有鐵卟啉輔基的細胞中的色素。它們參加生物氧化作用。在氧化過程中，它們分子中的鐵的化合價不斷發生改變 ($\text{Fe}^{+++} \rightleftharpoons \text{Fe}^{++}$)。氧化型細胞色素 (Fe^{+++} -細胞色素) 可以氧化還原型黃酶的輔基 (FMN 和 FAD)，而本身變成還原型細胞色素 (Fe^{++} -細胞色素)。細胞色素氧化酶可以氧化還原型細胞色素，還原型細胞色素氧化酶還可以將電子交給氧。作用圖解如下。



如果在含有細胞色素和細胞色素氧化酶的組織中加入 α -萘酚和對苯二胺，則氧化型細胞色素氧化這些物質而形成呡哚酚藍 (“Nadi”反應)。



氧化型細胞色素氧化酶使還原型細胞色素重新氧化。有氧存在時，還原型細胞色素氧化酶還可以被氧化。這樣，“Nadi”反應

可以不断地进行。KCN 抑制细胞色素氧化酶。

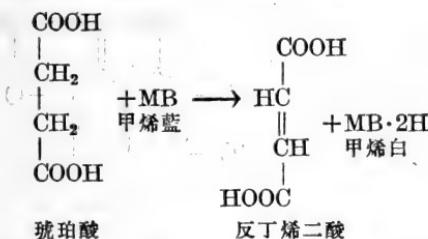
器材 玻璃表面皿。

試劑 (1)1% α -萘酚酒精溶液; (2)1%对苯二胺水溶液; (3)0.01M KCN 溶液(剧毒!)。

操作 取二表面皿，各加一块肝切片(或肌肉或馬鈴薯切片)。在一个表面皿的切片上加几滴0.01M KCN 溶液，再在两表面皿切片上各加几滴 α -萘酚酒精溶液-对苯二胺水溶液的等体积混合液。如有蓝色出現，则說明有细胞色素和细胞色素氧化酶存在。

实验四十一 琥珀酸脱氢酶活性的测定

以脱氢方式使物质氧化的酶，称为脱氢酶。琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环中的一个酶，能促使琥珀酸脱氢成为反丁烯二酸，并将脱下的氢传递给受氢体。用甲烯蓝作受氢体，結果甲烯蓝被氢还原生成无色的甲烯白。



在无氧环境下，琥珀酸脱氢酶的活性与甲烯蓝脱色速度成正比。使定量甲烯蓝脱色所需时间的倒数，可以用来表示酶的活性。

本实验用冻结琼脂制造无氧环境^①。这样，可以不用真空设备或氮气。

器材 (1)試管及試管架; (2)恒溫水浴鍋; (3)1毫升和2毫升吸量管; (4)燒杯。

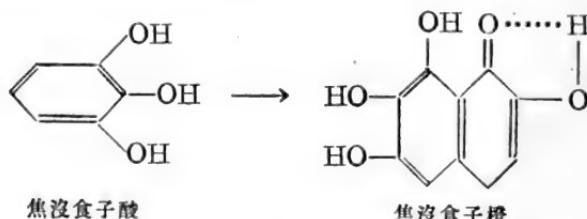
^① 如不用琼脂，可以用液体石蜡封盖反应液面，或使用 Thunberg 管。

試劑 (1)0.01% 甲烯藍溶液; (2)0.02M 琥珀酸溶液(中和到对石蕊試紙呈中性); (3)2% 琼脂溶液^[44]; (4)肌肉糜^[45]。

操作 取 2 支試管, 各加 0.02M 琥珀酸溶液 0.5 毫升、0.01% 甲烯藍溶液 1 毫升和 45°C 的 2% 琼脂溶液 2 毫升。再分別加入 0.5 克肌肉糜和煮过的肌肉糜。混匀后, 在冰中冷却, 使琼脂冻成凝胶。将試管放入 37°C 水浴中保溫, 随时观察并記錄甲烯藍脫色過程和時間。

实验四十二 过氧化物酶的定性反应

过氧化物酶能催化过氧化氢对某些物质的氧化。过氧化物酶的特异性不甚严格, 各种多酚或芳香族胺均可在此酶作用下, 被过氧化氢氧化。愈创木脂中的愈创木酸可被氧化成为蓝色的愈创木酸臭氧化物, 焦性没食子酸(邻苯三酚[C₆H₃(OH)₃])则被氧化生成橙紅色的焦没食子橙沉淀。



过氧化物酶广泛地存在于植物組織中。

器材 (1)試管及試管架; (2)2 和 5 毫升吸量管。

試劑 (1)0.3% 焦性没食子酸水溶液; (2)2% 过氧化氢溶液; (3)白菜提取液^[46]; (4)愈创木脂酒精溶液^[43]。

操作 (1)加白菜提取液約 5 毫升于試管內, 煮沸 2—3 分钟后, 冷却。

取 4 支标有号碼的試管, 各加 0.3% 焦性没食子酸溶液約 3 毫升。第 1 試管, 加 2% 过氧化氢 2 滴及蒸餾水 2 毫升。第 2 試管,

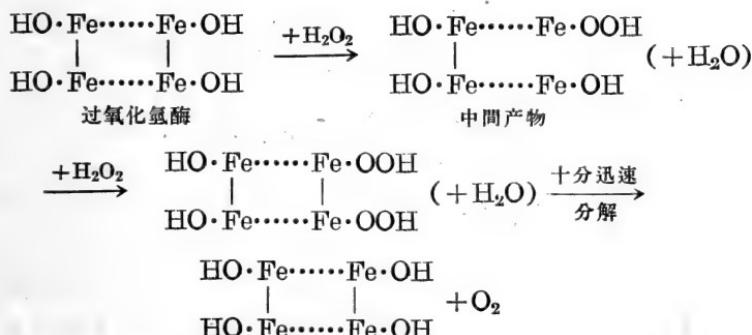
加白菜提取液2毫升。第3試管，加2%过氧化氢2滴及白菜提取液2毫升。第4試管，加2%过氧化氢2滴及煮过的白菜提取液2毫升。搖匀后，观察并记录各管顏色变化和沉淀的出現。

(2)取試管2支，各加愈創木脂溶液及2%过氧化氢溶液各0.5毫升。并分別加入白菜提取液和煮过的白菜提取液各几滴。观察并记录結果。

实验四十三 过氧化氢酶的定性反应

在生物机体内，某些代謝物由于需氧脱氢的結果而产生对机体有毒害作用的过氧化氢。过氧化氢酶能催化过氧化氢分解成水和分子氧。因此，过氧化氢酶具有保护生物机体的作用。

过氧化氢酶按其化学本质属于复合蛋白，其輔基是血色素。在催化过程中，一分子过氧化氢酶先与一分子过氧化氢結合。生成的中間产物既有过氧化氢酶作用，也有过氧化物酶作用；能催化另一个过氧化氢分子分解生成水和氧分子，也能氧化甲醇成为甲醛。在机体中，过氧化氢的濃度很低，过氧化氢酶可能主要起过氧化物酶的作用。



过氧化氢酶广泛地存在于动、植物組織中。它的抗热性較低，最适溫度为0—10°C。

器材 試管及試管架。

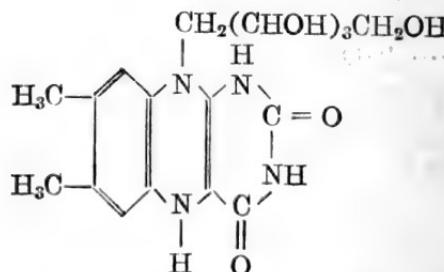
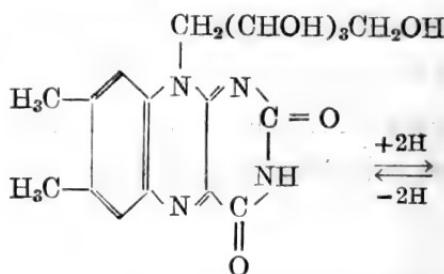
試劑 (1)2%過氧化氫溶液；(2)新鮮豬肝糜；(3)生馬鈴薯。

操作 (1)取2支試管，各加3毫升新配制的2%過氧化氫溶液。向1支試管中加磨碎的新鮮豬肝糜少許，向另1支試管中加約等量的、煮過的豬肝糜。觀察有無氣泡放出，特別注意肝糜的周圍。

(2)用生馬鈴薯和熟馬鈴薯重複以上實驗。可用馬鈴薯糜漿，也可用馬鈴薯小塊。

實驗四十四 黃酶的定性試驗

黃酶是以黃素核苷酸(FMN或FAD)為輔基的複合蛋白質——黃素蛋白。某些黃酶還含有鐵、銅或鉬。分子中核黃素部分能與氫原子可逆地結合，從而起遞氫作用：



屬於黃酶的有：能使還原型輔酶($\text{CoI}\cdot\text{H}_2$ 和 $\text{CoII}\cdot\text{H}_2$)脫氫的黃酶、氧化黃嘌呤成尿酸的黃嘌呤氧化酶、氨基酸氧化酶等。牛乳中的黃嘌呤氧化酶能催化水合甲醛把氫交給甲烯藍。



器材 試管及試管架。

試劑 (1)鮮牛乳; (2)1% 甲醛溶液; (3)0.02% 甲烯藍溶液。

操作 取 2 支試管，各加入 1 毫升 1% 甲醛溶液和 0.5 毫升 0.02% 甲烯藍溶液，再分別加入 5 毫升新鮮牛乳和煮沸的牛乳。放在 40°C 恒溫水浴中保溫。觀察甲烯藍退色，并記錄時間。

實驗四十五 碳酸酐酶的定性試驗

碳酸酐酶屬於分裂酶類，它催化下列反應：



紅血球中的碳酸酐酶在血液傳遞 CO_2 中具有重要作用。組織中產生的 CO_2 扩散到血漿並進入紅血球，在碳酸酐酶的作用下轉變成碳酸。在肺中，碳酸又在碳酸酐酶的作用下分解成 CO_2 和 H_2O ， CO_2 從紅血球擴散到血漿並進入肺泡，呼出體外。

碳酸酐酶在胃酸的形成中亦有重要作用。

器材 (1)試管和試管架; (2)小玻璃管。

試劑 (1)0.1% 酚紅溶液; (2)0.02M 碳酸氫鈉溶液; (3)新鮮血液。

操作 取 2 支試管，各加入 5 毫升 0.02M 碳酸氫鈉溶液和一滴酚紅指示劑。溶液顯紅色。通過小玻璃管吹入呼出氣，直至溶液成黃色為止。

取 4 滴血液，用 10 毫升蒸餾水沖稀並混勻。取一半煮沸並冷卻。立刻用吸量管把 1 毫升稀釋的血液移入第 1 個試管中，把 1 毫升煮過的血液移入另一試管中。然後在兩試管中各加入 2 滴

0.05N NaOH 溶液，并搖勻。兩試管應顯紅色。第 1 試管中顏色很弱並很快地消失，而第 2 試管中顏色改變很慢。記錄並解釋結果。

實驗四十六 蛋白酶活性的測定

酶的活性，可根據轉化一定量作用物所需時間來計算，也可根據在一定時間內為酶催化轉化的作用物的量來計算。

胃蛋白酶能催化水解蛋白質，其最適 pH 為 1.5—2.5。胃蛋白酶可特異地拆開由酪氨酸的氨基和二羧基氨基酸的羧基所形成的肽鍵，生成自由酪氨酸及含有酪氨酸的肽。我們可以使胃蛋白酶在一定條件下作用於一種蛋白質，加三氯醋酸除去未消化的蛋白質後，再用 Folin 氏試劑測定濾液內酪氨酸含量。濾液中的酪氨酸含量可作為胃蛋白酶活性的量度。

Anson⁽¹⁾(1932)曾用血紅蛋白為底物測定胃蛋白酶的活性。本實驗採用雞蛋清蛋白為底物。

器材 (1)50 毫升錐形瓶；(2)1 毫升、2 毫升、5 毫升和 10 毫升吸量管；(3)漏斗；(4)試管及試管架；(5)恒溫水浴鍋；(6)光電比色計。

試劑 (1)酸性雞蛋清蛋白溶液^[47]；(2)溶在 0.2% 盐酸中的 1% 的胃蛋白酶溶液；(3)5% 三氯醋酸溶液；(4)0.5N 氢氧化鈉溶液；(5)Folin 氏試劑^[36]；(6)標準酪氨酸溶液(0.2 毫克/毫升)。

操作 取 2 個 50 毫升錐形瓶，各加入 5 毫升酸性清蛋白溶液。在一錐形瓶中添加 1 毫升 1% 胃蛋白酶溶液，將 2 個錐形瓶放入 37°C 恒溫水浴內保溫。10 分鐘後取出，各添加 10 毫升 5% 三氯醋酸溶液，搖勻，並於第 2 個瓶(對照實驗)中加 1 毫升 1% 胃蛋白酶溶液，再搖勻。靜置 15 分鐘後過濾。

取消化樣品及對照實驗濾液各 2 毫升，分別置於兩試管內。

另取1支試管，加0.3毫升标准酪氨酸^①及2毫升对照實驗管濾液。向以上3支試管中各加5毫升0.5N的氫氧化鈉溶液^②和1毫升Folin氏試劑。在碱性液中，Folin氏試劑很易分解⁽²⁾，因此，每次添加Folin氏試劑應尽可能地快，并保持速度一致；加完后，立即充分搖混。靜置30分钟后，用黃色濾光板(580毫微米)在光电比色計上測光密度。使对照管的光密度为零。由各管溶液的光密度^③求出生成的酪氨酸量，并表示胃蛋白酶的活性。

参考书目

- (1) Anson, H. L., J. Gen. Physiol., 22, 79(1938).
- (2) Lowry, O. H. et al., J. Biol. chem., 193, 265(1951).

① 先将20毫克酪氨酸溶于0.1N盐酸中，轉入100毫升容量瓶，并稀釋到刻度。

② 碱度对顏色的影响很大。氫氧化鈉的濃度不足0.5N时，溶液呈不正常的草綠顏色。

③ 如消化样品管的光密度大于标准酪氨酸管的光密度，必須將消化濾液适当稀釋后重測光密度。只在一定范围内，光密度才与酪氨酸量成正比。

第六章 組織代謝

生物机体在其全部生命活动过程中，經常不断地与其周围环境进行物质交换。它一方面摄取外界物质，經過一系列的化学变化，改造成自身的組織；另一方面分解体内物质，产生能量，并将分解产物排出体外。生物机体的这种物质变化过程称为物质代謝。

生物体内物质代謝的各个方面是相互联系、相互制约的。例如，糖代謝、脂肪代謝和蛋白质代謝具有共同的交叉点，通过交叉点三类物质可以相互轉变。

动物、植物和微生物的营养方式不同，它們具有不同的代謝类型。植物以及一部分微生物能利用无机物来綜合有机物。动物以及大部分微生物則必須自环境中获得有机物。虽然如此，它們在糖、脂肪和蛋白质的代謝过程中，有許多地方是相似的。例如，在許多生物机体内，糖的无氧分解几乎都按照完全相同的过程进行。

本章将就組織中的糖、脂肪和蛋白质的某些中間代謝过程，进行实验。

實驗四十七 組織的自溶

在动物机体内，組織蛋白酶参予蛋白质的新陈代謝。組織蛋白酶在微酸性环境 ($pH=4-5$) 中作用最强。动物組織的自然环境接近中性，所以組織蛋白酶的作用不很明显。当組織脱离机体后，由于酸类物质的积聚而变为酸性，組織蛋白酶开始活动，結果組織蛋白质被分解，产生組織自溶現象。

組織蛋白质在自溶过程中分解成氨基酸，氨基酸量的增加可用 Folin 氏試剂檢驗。

器材 (1)表面玻璃; (2)50毫升錐形瓶; (3)2毫升和5毫升吸量管; (4)漏斗; (5)試管及試管架; (6)剪刀和镊子; (7)天平; (8)恒溫水浴鍋。

試劑 (1)醋酸盐緩冲溶液($\text{pH}=4.0$)^[48]; (2)15%三氯醋酸溶液; (3)0.5N NaOH 溶液; (4)Folin 氏試劑^[36]。

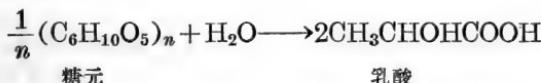
操作 将大鼠或家兔击头杀死，迅速取出肝臟，并在低溫下用剪刀剪成碎糜。称取組織糜两份，每份0.5克，分別放入两个盛有5毫升醋酸緩冲液的50毫升錐形瓶中。向第1号錐形瓶中立即加入2毫升15%三氯醋酸以破坏酶活性(对照)。混合均匀后，将两錐形瓶置于37°C恒溫水浴中，保溫3小时后取出。向第2号錐形瓶中加入2毫升15%三氯醋酸，并搖匀。15分钟后，将两样品过滤，把漏液分別滤入两試管內。

取2毫升滤液，加7毫升0.5N NaOH 溶液和1毫升Folin 氏試劑。混匀后，靜置5分钟。比較两个样品顏色的深淺，來估計組織自溶的程度。

实验四十八 糖元酵解作用⁽¹⁾

糖元在組織內进行无氧分解而生成乳酸的变化，称为糖元酵解作用。糖元酵解作用中間的变化过程頗为复杂。肌肉組織中的糖元首先与磷酸化合而分解，經過己糖磷酸酯、丙糖磷酸酯及丙酮酸等一系列中間产物，最后生成乳酸。

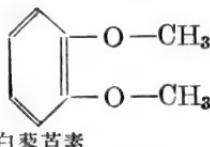
糖元酵解作用可綜合成下列反应：



糖元酵解作用是糖供給組織能量的一种代謝过程。在有氧条件下，組織內糖元酵解作用即受抑止，而有氧氧化則为代謝的主要途徑。糖元可用淀粉代替。

用不含完整細胞的肌肉提取液(即不能呼吸), 可以在有氧条件下, 进行酵解作用的实验。

糖元或淀粉酵解作用可由乳酸的生成来观测, 也可由乳酸与碳酸氢钠作用生成的 CO_2 在发酵管臂管中的积累而观测。乳酸与浓硫酸共热则变成乙醛, 后者与白藜芦素发生反应, 呈现红色。



白藜芦素

器材 (1)发酵管(图); (2)1毫升、2毫升和10毫升吸量管;

- (3) 試管及試管架; (4)漏斗; (5)10毫升量筒;
(6)天平; (7)恒溫箱。



图 9. 发酵管。 (8)0.125% 白藜芦素(无水酒精溶液)。

操作 取2支发酵管, 各加新鲜肌肉提取液8毫升。另取1支发酵管, 加煮沸过的肌肉提取液8毫升。向第1发酵管中, 加2毫升蒸馏水(对照); 向第2和第3发酵管中各加2毫升碳酸氢钠溶液和6—8滴甲苯。混匀(为便于混匀, 以上操作可在3支試管内进行。混匀后, 再倒入3支发酵管中)。倾斜发酵管, 使液体充满臂管, 切勿使臂管内含有气泡。以棉花小球堵塞管口, 放入37°C恒温箱中保温。

24小时后, 取出发酵管, 注意各管臂管中有无气体, 比较并解释产气量①。

① 在煮沸过的肌肉提取液中, 酵解酶体系已被破坏。发酵管内不应有乳酸产生, 臂管中也不应有显著量的二氧化碳积累。在实验中, 如果发现相反现象, 改用未经微生物污染的新鲜肌肉提取液, 重作实验。

用白藜芦素反应可检定乳酸⁽²⁾。与浓硫酸小心地共热时，乳酸转变成乙醛。乙醛与白藜芦素发生反应，生成红色的缩合物。糖、丙酮酸和甲醛也发生类似的反应⁽³⁾。为了检定乳酸，必须除去溶液中的糖和蛋白质。为此，取各发酵管的滤液5毫升，分别放入3支试管。向各试管内加硫酸铜溶液1毫升，混匀；再加氢氧化钙粉末0.5克，用力振荡。因皮肤上有乳酸，振荡时，勿使手指接触液体。放置30分钟，并不时振荡，使糖沉淀完全。过滤，除去沉淀。取上述三种滤液各0.5毫升，分别加入另外3支试管中。将试管置冰水中，用量筒量取浓硫酸1.5毫升，徐徐加入，同时不断地振荡试管。此时，溶液应无色透明。如果浓硫酸加得太快，溶液温度急剧上升，由乳酸生成的乙醛或被氧化成乙酸，或挥发，结果一部分乳酸损失。将加完浓硫酸的3支试管，一起放入沸水浴中煮4分钟（准确！）。取出后，立刻浸入冰水中冷却。各加白藜芦素溶液4—5滴。混匀。于室温下静置20分钟后，比较和记录各管溶液的颜色（见106页的注），并解释结果。

实验四十九 发酵过程中无机磷的利用

酵母能将蔗糖和葡萄糖发酵成为乙醇及二氧化碳。发酵作用和酵解作用的基质和最终产物虽然不同，但其中间化学步骤则几乎完全一样。在发酵过程中，葡萄糖首先经过磷酸化，生成己糖磷酸酯、丙糖磷酸酯及其他磷酸酯等中间产物。

葡萄糖的磷酸化反应，可以由反应混合物中无机磷的消失来观测。磷酸与钼酸相作用生成磷钼酸的络合物，后者能被 α -1, 2, 4氨基萘酚磷酸钠还原成钼蓝。据此，可测定无机磷。

器材 (1) 乳钵及杵；(2) 试管及试管架；(3) 1毫升和5毫升吸量管；(4) 漏斗；(5) 10毫升刻度离心管；(6) 100毫升容量瓶；(7) 恒温水浴锅。

試劑 (1)磷酸盐溶液^[69]; (2)新鮮啤酒酵母; (3)蔗糖; (4)5%三氯醋酸溶液; (5)5N 硫酸和2.5%鉬酸銨等体积混合液; (6) α -1, 2, 4-氨基萘酚磷酸鈉溶液^[30]。

操作 称取約2克酵母, 置于乳鉢內。加1克蔗糖、5毫升水和5毫升磷酸盐溶液, 仔細磨勻。用吸量管取出1毫升均匀的悬浮液, 置于試管中(試样1)。加3毫升三氯醋酸。搖勻。把剩余的悬浮液移入另一試管, 并在37°C恒溫水浴中保溫。每隔30分钟取出1毫升悬浮液, 共取3次(試样2, 3和4)。

吸取悬浮液以前, 注意用力搖勻試管中混合物。取出后, 立即加入3毫升三氯醋酸溶液。将4个試样分別過濾, 取濾液各1毫升, 置于100毫升容量瓶內, 用水稀釋至刻度。取出稀釋液1毫升, 移入10毫升刻度離心管內。加2.5毫升鉬酸銨溶液和0.5毫升 α -1, 2, 4-氨基萘酚磷酸鈉溶液。混勻后, 靜置15分钟。比較各管藍色的深淺。可以看出, 隨着發酵過程的進行, 反應混合物中無機磷含量逐漸減少。

實驗五十 脂肪酸的氧化⁽⁴⁾

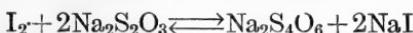
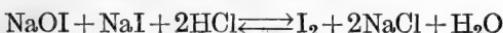
根據 β -氧化學說, 机体組織能使脂肪酸氧化生成乙酰輔酶A。兩分子乙酰輔酶A可縮合成乙酰乙酸。在肝臟內, 乙酰乙酸可脫羧生成丙酮, 也可還原生成 β -羥丁酸。乙酰乙酸、 β -羥丁酸和丙酮總稱為酮體。酮體為机体代謝的中間產物。在正常情況下, 其產量甚微; 患糖尿病或食用高脂肪膳食時, 血中酮體含量增加, 尿中也能出現酮體。

本實驗用新鮮肝糜^①與丁酸保溫, 生成的丙酮可用碘仿反應來測定^(5,6)。在碱性條件下, 丙酮與碘生成碘仿。反應式如下:

① 肝糜必須新鮮。放置久的肝臟, 喪失氧化脂肪酸的能力。



剩余的碘，可用标准硫代硫酸鈉滴定。



根据滴定样品与滴定对照所消耗的硫代硫酸鈉之差，可計算由丁酸氧化生成的丙酮量。

器材 (1)玻璃皿；(2)50毫升錐形瓶；(3)試管及試管架；(4)2毫升和5毫升吸量管；(5)漏斗；(6)5毫升微量滴定管；(7)剪刀和镊子；(8)天平；(9)恒溫水浴鍋。

試劑 (1)Locke 氏溶液^[50]；(2) $\frac{1}{15}M$ 磷酸緩冲液($\text{pH}=7.6$)；(3)0.5N 丁酸溶液^[51]；(4)15% 三氯醋酸溶液；(5)10% 氢氧化鈉溶液；(6)10% 盐酸；(7)0.1N 碘溶液^[52]；(8)0.1N 硫代硫酸鈉溶液^[16]；(9)0.1% 淀粉溶液。

操作 用重物击毙动物(家兔、大鼠或豚鼠)，并迅速把血放尽。取出肝臟，在玻璃皿上剪成碎糜。

取50毫升錐形瓶两个，各加3毫升Locke 氏溶液和2毫升 $\text{pH}=7.6$ 磷酸緩冲液。在一錐形瓶內，加3毫升0.5N 丁酸溶液，另一錐形瓶作对照。取約0.5克肝組織两份(要等重)，分別置于两錐形瓶內。混勻。在 37°C 恒溫水浴內保溫。

保溫2小时后，取出錐形瓶，各加入2毫升三氯醋酸。在对照瓶中加入3毫升0.5N 丁酸。混勻。靜置15分钟后，过滤。另取两錐形瓶，分別量入5毫升滤液、5毫升0.1N 碘溶液和5毫升10% 氢氧化鈉溶液。搖勻后，靜置10分钟。加入5毫升10% 盐酸，用0.1N 硫代硫酸鈉溶液滴定剩余碘。滴至淺黃色时，加入3滴淀粉溶液作指示剂。搖勻并繼續滴到藍色消失。記錄滴定样品

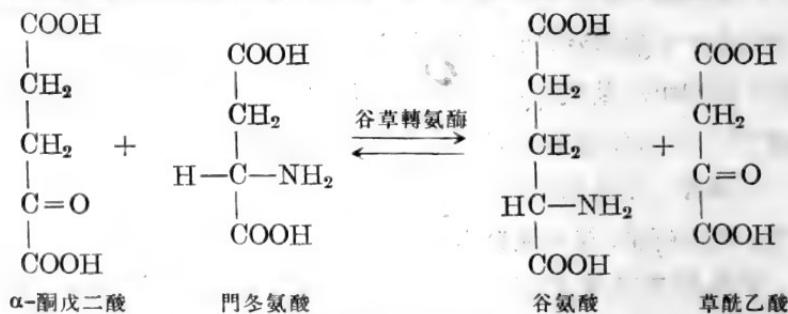
与对照所用硫代硫酸鈉的毫升数，并計算样品中丙酮含量^①。

实验五十一 氢基转移反应(一)

谷丙氨基移換酶活性的測定^②

(光电比色法)⁽⁷⁾

氨基移換酶也称轉氨酶，为广泛存在于生物机体内的酶。其作用为催化 α -氨基酸的 α -氨基与 α -酮酸的 α -酮基互换。因此，在氨基酸的合成和分解，尿素和嘌呤的合成等中間代謝过程中有重要作用。轉氨酶的种类甚多，任何一种氨基酸进行轉氨作用时，都由其专一的轉氨酶催化。它们的最适 pH 接近 7.4。在各种轉氨酶中，谷氨酸-草酰乙酸轉氨酶(简称谷草轉氨酶)及谷氨酸-丙酮酸轉氨酶(简称谷丙轉氨酶)活力最强。它们催化的反应如下：



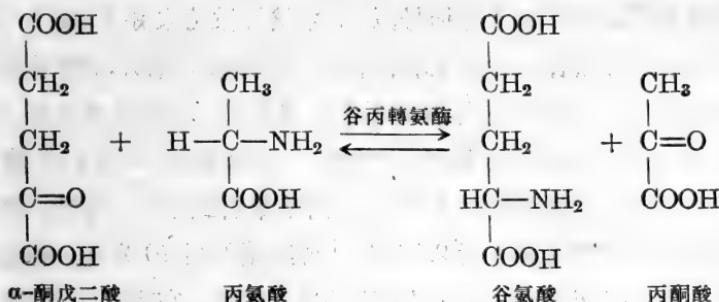
① 先求与 1 毫升 0.1N 硫代硫酸钠相当的丙酮量。再由样品和对照消耗硫代硫酸钠之差，计算样品滤液中的丙酮含量。

^② 本测定方法亦可用于谷草轉氨酶活性測定。但需注意以下三点：

1. 转氨酶底物不是 α -酮戊二酸和丙酮酸，而是 α -酮戊二酸和门冬氨酸，其配制方法是取分析纯 α -酮戊二酸 29.2 毫克，DL-门冬氨酸 2.66 克，置于小烧杯内，加 1N NaOH 使完全溶解。用 1N NaOH 或 1N HCl 调 pH 至 7.4 后，再加磷酸缓冲液至 100 毫升，最后加氯仿数滴防腐。此溶液每 1.0 毫升含 α -酮戊二酸 2.0 微克分子 (μm)，门冬氨酸 200 微克分子。在冰箱内可保存一周。

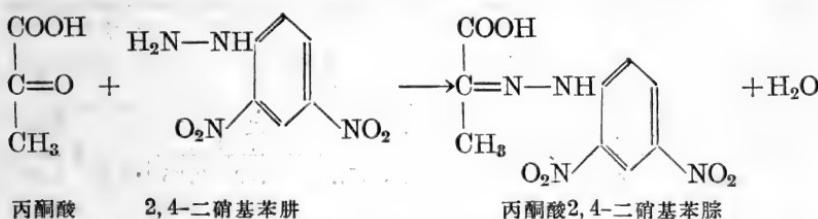
2. 由于谷草轉氨酶在反應結束生成的草酰乙酸容 易自行轉變生成丙酮酸。丙酮酸的生成量與草酰乙酸的量有一定平衡關係。因此，也可用測定丙酮酸法，計算谷草轉氨酶活性。

3. 谷草转氨酶活力的测定受 pH、温度、保温时间长短、样品新鲜程度、溶血等因素影响。



上述两种轉氨酶均广泛存在于机体組織內，在正常人血清中也有少量。机体发生肝炎、心肌栓死等病变时，血清中轉氨酶活力常显著增加，所以在临床診斷上轉氨酶活力的測定有重要意义。

测定轉氨酶活力的方法很多，如分光光度法、紙上层析法及光电比色法等。普遍采用的是光电比色法。在本方法中，谷丙轉氨酶作用于丙氨酸和 α -酮戊二酸后，生成的丙酮酸与2,4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸2,4-二硝基苯腙。



丙酮酸2,4-二硝基苯腙加碱处理后呈棕色。从丙酮酸2,4-二硝基苯腙的生成量，可以計算酶的活力。

器材 (1)試管；(2)吸量管；(3)恒溫水浴鍋；(4)光电比色計。

試劑 (1)0.1M 磷酸緩冲液(pH7.4)；(2)丙酮酸鈉标准溶液(2.0微克分子/毫升)^[53]①；(3)谷丙轉氨酶底物^[54]；(4)2,4-二硝基苯肼溶液^[55]；(5)0.4N 氢氧化鈉。

① 如发现丙酮酸标准液混浊(可能是細菌污染)，則須重新配制。

操作 取兩支試管并标号，第1号試管做为未知管，第2号試管做为空白对照管。各加入谷丙轉氨酶底物0.5毫升，置于37°C水浴內10分钟，使管內外溫度平衡。取血清0.1毫升加入第1号試管內，兩支試管再放入37°C水浴中，继续保溫60分钟。整60分钟时，向兩支試管內加入2,4-二硝基苯肼試剂0.5毫升，然后再向第2号試管內加血清0.1毫升，再继续保溫20分钟。保溫終了时，向兩試管中各加入0.4N NaOH 5毫升。在室溫下靜置30分钟后，用520毫微米濾光片进行比色測定未知管的光密度(在显色后30分钟至2小时内其色度稳定)。用光密度讀数在标准曲线上查出轉氨酶活力的单位数。計算每100毫升血清中轉氨酶的活力单位数^①。

标准曲線的繪制：

取6支試管，分別用0、1、2、3、4、5标号。按下表所列的次序添加各試劑：

試 劑	試 管 號					
	0	1	2	3	4	5
丙酮酸鈉標準液(毫升)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
谷丙轉氨酶底物*(毫升)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25
磷酸緩沖溶液(0.1M, pH7.4)(毫升)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

* 在呈色反应中，2,4-二硝基苯肼可与有酮基的化合物作用形成苯腙。底物中的α-酮戊二酸可与之发生反应，生成α-酮戊二酸苯腙。因此，在做标准曲線时，須加入一定量的底物(內含α-酮戊二酸)以抵銷由α-酮戊二酸产生的消光影响。

將試管置于37°C水浴中保溫，平衡管內外溫度。向各管內加0.5毫升2,4-二硝基苯肼后再保溫20分钟，最后，分別向各管內加入0.4N NaOH 5毫升。在室溫下靜置30分钟后，以0号管做空

① 在本实验条件下，每1微克分子丙酮酸代表1.0单位酶活力。

白，用520毫微米滤光片进行比色，读出光密度。以丙酮酸的微克分子数为横坐标，光密度为纵坐标，画出标准曲线。

实验五十二 氨基移换反应(二)

谷丙氨基移换酶活性的测定

(纸上层析法)

在前一实验中已提到，转氨酶活性测定除光电比色法、分光光度法等以外，还有纸上层析法。

用纸（常用滤纸）作为惰性支持物的层析法叫做纸上层析法。此法已发展成为生物化学研究和生产实际中的一项重要而简便的分析方法^(8,9)。

层析溶剂是由有机溶剂和水组成，当有机溶剂和水部分互溶时，即分成二相：一相是以水饱和的有机溶剂相，一相是为有机溶剂饱和的水相。滤纸纤维和水有着较强的亲和力，而与有机溶剂则亲和力较弱，因此滤纸可以看作是含有静止水相的惰性支持物。水相因此称为静止相，有机相称流动相。当有机相沿纸流动经过层析点时，层析点上溶质便在水相和有机相之间进行分配，有一部分溶质离开原点随有机相移动，而进入无溶质的区域，这时又重新进行分配，一部分溶质从有机相移入水相。当有机相不断流动时，溶质也就不断进行分配，沿着有机相流动方向移动。溶质中各种不同组份的移动速率不同时，就可以彼此分开。溶质在纸上移动的速率可以用 R_f 值表示（图10）：

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}} = \frac{A}{B}$$

不同物质在一定条件下，有其特异的 R_f 值。 R_f 值的大小与物质的化学性质，溶剂系

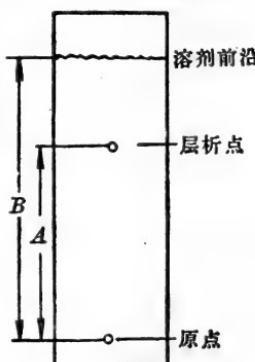


图10. 层析纸条。

統，層析濾紙的質地，層析溫度等因素有關。

本實驗利用濾紙層析法檢查由谷氨酸和丙酮酸在谷丙轉氨酶的作用下所生成的丙氨酸來證明轉氨作用。

器材 (1)50 毫升錐形瓶；(2)1 毫升和 2 毫升吸量管；(3)漏斗；(4)試管及試管架；(5)剪刀和鑷子；(6)恒溫水浴鍋；(7)干的大試管(直徑 20 毫米，長 200 毫米)；(8)毛細管；(9)層析濾紙(寬 15 毫米，長 150 毫米)；(10)烘箱；(11)噴霧器。

試劑 (1)谷氨酸溶液^[56]；(2)丙酮酸鈉溶液(11 毫克/毫升)；(3)0.1% 碳酸氫鉀溶液；(4)15% 三氯醋酸；(5) $\frac{1}{500}M$ 一溴醋酸溶液；(6)酚溶劑^[57]；(7)0.1% 苛三酮酒精溶液；(8)標準丙氨酸溶液(0.04%)。

操作 取 4 個標有號碼的錐形瓶。在第 1 號和第 4 號兩瓶中加入谷氨酸溶液、丙酮酸鈉溶液各 1 毫升和 0.1% 碳酸氫鉀溶液 2 毫升，在第 2 號瓶中加入丙酮酸鈉溶液 1 毫升和 0.1% 碳酸氫鉀溶液 3 毫升，在第 3 號瓶中加入谷氨酸溶液 1 毫升和 0.1% 碳酸氫鉀溶液 3 毫升。最後在 4 個錐形瓶中各加入 0.5 毫升 $\frac{1}{500}M$ 一溴醋酸溶液。

將剛殺死的大鼠或兔的肌肉在低溫下研碎。稱取 4 份，每份各 1 克，分別放入 4 個錐形瓶中並向第 4 號瓶立即加入 2 毫升 15% 三氯醋酸溶液。將各瓶內容物搖勻後，置於 37°C 恒溫水浴中保溫，並經常搖動。在 $1\frac{1}{2}$ —2 小時後取出並向第 1、2、3 號瓶中各加入 2 毫升 15% 三氯醋酸溶液。混勻。放置 15 分鐘以沉淀蛋白質。過濾，把濾液濾入試管中。用塞塞緊，放置於低溫處備用。樣品可按下列兩種方法進行層析：

(I) 取滤纸条(宽15毫米, 长160毫米)4条, 分别在其一端用铅笔标上第1—4号。不要用手直接接触纸条。

在其另一端距边缘1厘米处, 用铅笔轻画一条与纸边平行的底线, 用4根毛细管取以上4个管中的滤液分别对号点在滤纸条底线的中心上, 毛细管口轻轻触到纸面上使滤液分别成直径为2—3毫米的圆斑(图11)。为使有足够的样品点在滤纸上, 每一样品应重

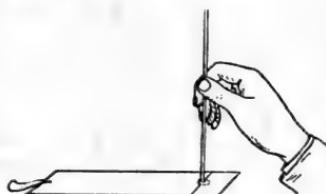


图11. 点样。

复点3—4次, 每次点样后, 待凉干(或用吹风机吹干)再点下一次。

在准备好的干大试管中, 加入2毫升酚溶剂, 不要让溶剂沾在试管壁上(注意酚会烧伤皮肤), 并将管直立在架子上。在已点好样的滤纸上端打一孔, 并用线挂在大试管塞的钩子上。随后, 将滤纸条移入大试管中, 不要使滤纸浸入酚溶剂。盖上塞。过30分钟, 再

将滤纸条降低, 使浸入酚溶剂2—3毫米(图12)。注意不要使滤纸条贴在试管壁上。将塞盖严。待酚溶剂走到离滤纸上端2厘米处时(约需 $1\frac{1}{2}$ —2小时), 取出滤纸, 在100°C

烘箱中烘10—15分钟, 以除去酚溶剂。用喷雾器向滤纸喷0.1% 苷三酮酒精溶液, 喷湿后, 放入60°C烘箱中10—15分钟。氨基酸与苷三酮进行反应, 在滤纸上呈现紫红色斑点。与标准样品(标准谷氨酸和丙氨酸, 层析操作同样品)比较, 确定各点是什么氨基



图12. 試管层析装置。 基酸。

實驗結果如圖 13。1

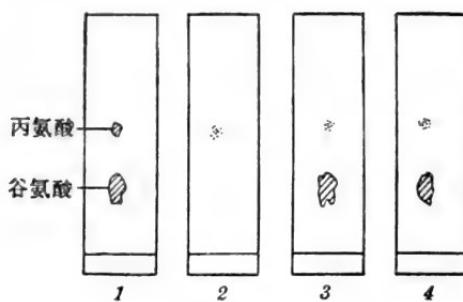


圖 13. 層析結果示範。

3、4 号中能看到丙氨酸痕迹斑点，比 1 号要淡得多。

(II) 如条件允許，最好用层析罩在层析室内层析，其方法如下。

两人合用滤纸一张(寬15厘米，長20厘米)，在其一端距边缘1.5厘米处用鉛筆輕画一条与紙邊平行的底綫。在紙上每隔2厘米处用鉛筆点一小点，共9点，点外画一半徑为1.5毫米的小圆圈(图14)，依上法将样品(每人4点)和标准丙氨酸(1点)点在层析紙上。点完后，将滤纸卷成圓筒，并用綫将两端縫合，如图15。縫时，需注意在两紙端間留一寬縫，

以免接触产生毛細現象。縫好后放入层析罩内，如图16。用被酚所饱和的水(平衡溶剂)平衡20分钟(在制备酚溶剂时，分液漏斗的上层溶液即为被酚所饱和的水溶液)。平衡后，从上口，用带小漏斗的玻璃管加入酚溶剂25毫升于层析缸內。加完后，立即盖紧塞子。当溶剂前沿行至距紙端約2厘米处时，取出凉干，按前面所述方法显色。

号加有完全的反应体系，2号缺谷氨酸，3号缺丙酮酸，4号酶已被15%三氯醋酸破坏。因此，只有一号滤紙条上出現谷氨酸和丙氨酸层析点。但由于肌肉中有少量游离氨基酸特別是丙氨酸，有时在2、

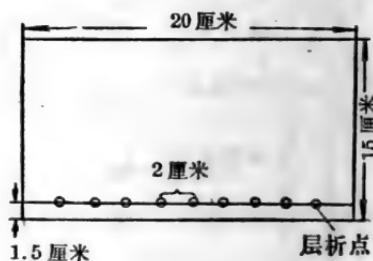


圖 14. 層析滤紙及尺寸点样位置。

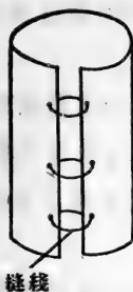


图 15. 卷成圓圈的层析滤紙。

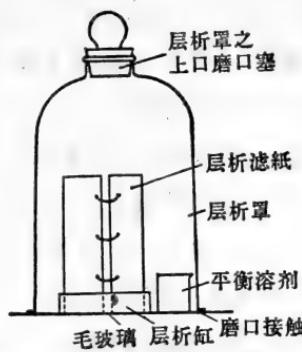


图 16. 钟罩层析装置。

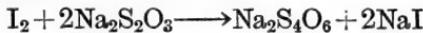
實驗五十三 氨基酸的生酮作用

氨基酸在組織內的中間代謝過程中，可轉變成糖和脂肪類中間代謝產物。有些氨基酸是“生糖”的，能轉變成葡萄糖或糖元；有些是“生酮”的，能轉變成酮體。酪氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和異亮氨酸均为生酮氨基酸。

將生酮氨基酸與肝組織混合保溫，即可觀察到酮體的生成。酮體中之丙酮在鹼性環境中，能與碘作用生成碘仿。



如果向樣品中加入一定量的碘，與丙酮作用後，剩余的碘可用硫代硫酸鈉來滴定。



器材 (1)玻璃皿；(2)50毫升錐形瓶；(3)2毫升和5毫升吸量管；(4)漏斗；(5)試管及試管架；(6)5毫升微量滴定管；(7)剪刀和鋸子；(8)天平；(9)恒溫水浴鍋。

試劑 (1)生理鹽溶液^[70]；(2)0.1M 亮氨酸溶液；(3)15%三氯醋酸溶液；(4)10% 氢氧化鈉溶液；(5)0.1N 碘溶液^[523]；(6)10%

盐酸; (7) 0.1N 标准硫代硫酸鈉溶液^[16]; (8) 0.1% 淀粉溶液。

操作 击头杀死家兔或大鼠。立即取出肝臟，置于玻璃皿中，在低溫下剪成碎糜。

取两个 50 毫升錐形瓶。在一錐形瓶內，加 3 毫升生理盐溶液和 3 毫升 0.1M 亮氨酸溶液，另一錐形瓶內加 6 毫升生理盐溶液（对照）。称取 0.5 克肝組織糜两份，分別放入两个錐形瓶內。將錐形瓶置于 37°C 恒溫水浴內保溫 2 小時。

保溫后，取出錐形瓶，各加 15% 三氯醋酸溶液 2 毫升，混匀后，靜置 15 分钟。过滤，将滤液滤入試管內。另取两个錐形瓶，分別加入 5 毫升滤液，5 毫升 0.1N 碘溶液和 5 毫升 10% 氢氧化鈉溶液，并搖匀。靜置 10 分钟后，加入 5 毫升 10% 盐酸和几滴 0.1% 淀粉溶液，用 0.1N 硫代硫酸鈉溶液来滴定剩余碘。計算样品中丙酮含量。

参考書目

- (1) Збарский, Б. И., Збарский, И. Б., Солцев, А. И., Практикум по биологической химии, стр. 153 (1954).
- (2) Baker, S. B., Am. J. Physiol., **129**, 305 (1940).
- (3) Koch, F. C. and Hanke, M. E., Practical Methods in Biochemistry, 6th Ed., p. 215 (1953).
- (4) Jowett, M. and Quastel, J. H., Biochem. J., **29**, 2143 (1935).
- (5) Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M., Biochem. J., **27**, 1753 (1933).
- (6) Фердман, Д. Л. и Сопин, Е. Ф., Практикум по биологической химии, стр. 97 (1957).
- (7) 临床檢驗杂志, 第 3 期, 总 135—140 頁, 1960年.
- (8) 潘家秀等, 蛋白質化学研究技术, 34 頁 (1962).
- (9) Consden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. J. P., Biochem. J., **38**, 224 (1944).

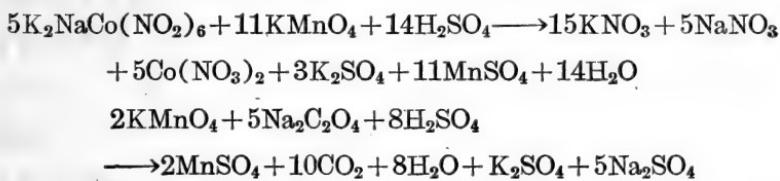
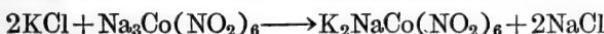
第七章 血液定量分析

实验五十四 血清钾的测定

(Clausen, Kramer 和 Tisdall 滴定法)⁽¹⁾

常人血清中每 100 毫升，约含钾 16—22 毫克，变动范围不大。患肺炎及急性传染病时，其量稍减。血球中之钾含量较高，每 100 毫升全血约含 150—250 毫克。因此，制取样品时，应避免溶血，血清也必须迅速从凝块中分出，否则，可能有一部分钾从血球渗入血清。血取出后，应在 1—2 小时内将血清分出。

血中的钾与亚硝酸钴钠发生反应，生成黄色的亚硝酸钴钠钾沉淀。用标准高锰酸钾溶液使此沉淀氧化分解。剩余的高锰酸钾用过量的标准草酸钠溶液还原。剩余的草酸钠再用标准高锰酸钾反滴定。这样，可以算出样品中钾的含量。1 毫升 0.02N 高锰酸钾可以氧化分解含有 0.142 毫克钾的亚硝酸钴钠钾⁽¹⁾。



器材 (1)1 毫升、2 毫升和 5 毫升吸量管；(2)15 毫升刻度离心管；(3)50 毫升锥形瓶；(4)水浴锅；(5)微量滴定管；(6)离心机。

试剂 (1)亚硝酸钴钠溶液^[58]；(2)0.02N 草酸钠溶液^[59]；(3)

⁽¹⁾ Hoffmann 和 Jacobs⁽²⁾对此法作了改进。在亚硝酸钴钠钾沉淀中先加入盐酸胆固醇，再加亚铁氰化钾，产生绿色。用适当标准进行比色测定。

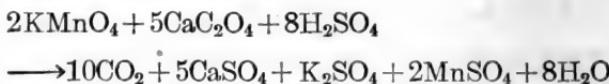
0.02N 高錳酸鉀溶液^[60]; (4)1:2 亞硝酸鈉溶液^[61]。

操作 用吸量管將 1 毫升血清, 量入 15 毫升刻度離心管。加 1:2 亞硝酸鈉溶液 0.5 毫升, 搖勻。靜置 5 分鐘, 加水稀釋至 4 毫升, 再搖勻。然後慢慢加入亞硝酸鈷鈉試劑 2 毫升, 靜置 30 分鐘。置離心機中, 以每分鐘 1,500 轉速離心 5 分鐘。除去上層清液至 0.3 毫升刻度, 加水 5 毫升洗滌, 勿搖動沉淀。再置離心機中離心 3 分鐘, 除去洗液。如上洗三次至上層清液無色後, 加 2 毫升 0.02N KMnO_4 及 1 毫升 4N H_2SO_4 。用玻棒攪勻, 置沸水中加熱約 1 分鐘, 應得紅色澄清溶液。加 0.2N $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液 2 毫升, 还原過量的 KMnO_4 。過量的 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 以 0.02N KMnO_4 滴定。輕微的粉紅色為滴定終點。計算每 100 毫升血清中鉀的含量。

實驗五十五 血清鈣的測定

常人血清每 100 毫升約含鈣 9—11 毫克, 儿童血清鈣稍高。手足搐搦症或軟骨病患者, 血中鈣量減低, 常在 7 毫克% 以下。割除付甲狀腺後, 动物血中之鈣量頓減; 反之, 如注射付甲狀腺提取液, 其鈣量即增高。

血鈣絕大部分存在血清中, 血球中很少, 所以血鈣的定量測定常用血清^①。先用草酸銨將血清鈣變成草酸鈣沉淀。沉淀溶于硫酸後, 用標準高錳酸鉀溶液滴定^(3,4)。



器材 (1) 1 毫升、2 毫升及 5 毫升吸量管; (2) 15 毫升刻度離心管; (3) 50 毫升錐形瓶; (4) 水浴鍋; (5) 微量滴定管; (6) 縱心機。

① 防止溶血, 因為鈣在血球和血清之間的分布很不均勻。

試劑 (1) $0.01N$ 高錳酸鉀溶液(1毫升=0.2毫克鈣)^[60](高錳酸鉀溶液不很穩定，每經數日須標定一次)；(2) 4% 草酸銨溶液；(3)稀氨水(以水稀釋2毫升濃氨至100毫升)；(4) $1N$ 硫酸。

操作 用吸量管將血清1毫升移入15毫升離心管中，加蒸餾水3毫升和4% 草酸銨1毫升。充分搖勻，靜置30分鐘後，再搖勻。離心使草酸鈣沉于管底。小心取出離心管(勿使沉淀振起)，小心迅速傾出上清液後，將離心管倒置濾紙上。稍停，用濾紙將管口擦干，再以稀氨水3毫升，沿管壁沖洗。輕敲管底，使大部分沉淀被搖起。再離心5分鐘，用前法除去上清液。小心用吸量管吸 $1N$ 硫酸2毫升，吹入管內，使沉淀被擊起而易于溶解，將離心管置于沸水浴中約1分鐘^①，趁熱以 $0.01N$ 高錳酸鉀溶液滴定，至淡紅色時經1分鐘不褪，即為終點。

取1毫升蒸餾水代替血清作對照實驗。

實驗五十六 血中無機磷的測定

常人血液中每100毫升含無機磷約3.5毫克，嬰兒及孩童約含5毫克。患佝僂病者可降至2毫克。

無機磷在血漿及血球中的濃度約略相等，磷酸酯則絕大部分在血球中。血漿中有磷酸酶，當血液放置時，一部分磷酸酯即被磷酸酶催化水解，因而無機磷酸鹽的量增高。此種變化，在有溶血現象時更顯著，所以測定無機磷或磷酸酯，須用新鮮樣品。血液抽出後，不可超過1—2小時，並要預防溶血^②。

用三氯醋酸沉淀血中蛋白質，制備無蛋白血濾液。無機磷酸鹽則溶存於濾液中。無機磷可與鉬酸銨發生反應，生成磷鉬酸銨。

① 最好保持在70—75°C。溫度过低反應速度慢，過高則草酸鈣可能分解。

② 為了避免溶血，最好用血清進行測定，并在取血後立即測定。

用硫酸亚铁^①或其他还原剂还原磷钼酸銨，使成鉬藍，鉬藍大致成分为 $(\text{MoO}_2\cdot\text{MoO}_3)_2\cdot\text{H}_3\text{PO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。藍色相当稳定，在适当条件下，可用比色法測量其深淺度。在一定范围内，顏色的深度和样品中磷含量成正比关系。

器材 (1) 0.5 毫升、1 毫升、2 毫升及 5 毫升吸量管；(2) 50 毫升錐形瓶；(3) 試管；(4) 光电比色計(或目視比色計)。

試劑^② (1) 20% 三氯醋酸；(2) 5% FeSO_4 ；(3) 鉬酸銨溶液^[62]；(4) 标准磷酸溶液(每毫升含 0.01 毫克磷)^[63]。

操作 用 1 毫升吸量管将 1 毫升全血^③(或血清)，量入 50 毫升錐形瓶。加水 6 毫升和 20% 三氯醋酸 3 毫升(如为全血，加水后立即加三氯醋酸)。用力混匀，并放置 5 分钟后，用不含磷酸盐的优质滤紙过滤。血滤液应清亮无色。保存滤液备用。

取試管 2 支，按下表配制：

加 入 項 目	未 知 管	对 照 管
1. 血滤液	5 毫升	—
2. 标准磷酸盐溶液	—	2 毫升
3. H_2O	2.5 毫升	4 毫升
4. 20% 三氯醋酸溶液	—	1.5 毫升
5. 鉬酸銨試劑	0.5 毫升	0.5 毫升
6. 5% FeSO_4	2 毫升	2 毫升

将以上二管分別混匀，放置 10 分钟后用光电比色計(或目視比色計)比色^④。計算每 100 毫升全血中的磷含量。

① Kuttmer 和 Lichtenstein⁽⁵⁾用氯化亞錫作为还原剂，使灵敏度增加。可用更少的样品进行分析。但沒有 Fiske 和 Subbarow 法⁽⁶⁾准确度大。

② 所用試劑必須純淨，不含磷酸根。

③ 如使用加草酸鉀作抗凝剂，草酸鉀不能过多，否則不易显色。每毫升样品內草酸鉀含量不多于 2—3 毫克。

④ 如用光电比色計比色，可先用标准磷酸溶液制出磷量-光密度曲綫(用 660 毫微米濾光板)。

实验五十七 血中胆固醇的测定

人血液每100毫升約含胆固醇100—230毫克。患慢性或急性肾炎及糖尿病者，其血液之胆固醇常有增加。患剧性贫血症則降低。膳食中脂肪高时，血中胆固醇含量亦高，反之則低。

血液或血浆烘干后，以氯仿浸提胆固醇^①。胆固醇与醋酸酐、浓硫酸作用后，呈綠色(反应机制請參看“类脂的分离与鉴定”实验)。用比色計进行比色。此色彩漸变黃色，故比色宜迅速。

器材 (1) 0.5毫升、2毫升和10毫升吸量管；(2)带有螺旋冷凝器的提取管⁽⁸⁾；(3)带刻度試管；(4)光电比色計；(5)水浴鍋。

試剂 (1)氯仿；(2)醋酸酐；(3)濃硫酸；(4)胆固醇标准液(5毫升含0.5毫克胆固醇。胆固醇50毫克溶于500毫升氯仿)。

操作 用吸量管取0.5毫升血液滴于直徑5—7厘米的无脂滤紙上。在70°C烤箱內烘干后，将紙折迭，悬挂于螺旋冷凝器下，插入管中，管內盛氯仿8毫升。置管于70—80°C水浴中，热40分钟。冷后，加氯仿至10毫升，醋酸酐2毫升和濃硫酸0.2毫升。同时取5毫升标准胆固醇溶液，移入另一試管中，加氯仿5毫升，醋酸酐2毫升和濃硫酸0.2毫升。将二管塞紧，搖匀，置暗处約5分钟后，以光电比色計(或目視比色計)比色，并計算每100毫升血液中胆固醇含量。

参考书目

- (1) Kramer, B. and Tisdall, F. F., J. Biol. Chem., 46, 339 (1921).
- (2) Hoffmann, W. S. and Jacobs, H. R. D., J. Biol. Chem., 93, 685 (1931).
- (3) Clark, E. P. and Collip, J. B., J. Biol. Chem., 63, 461 (1925).

① 或用酒精-乙醚混合液(3:1)抽提[Sachett⁽⁷⁾]。

- (4) Sendroy, J., Jr., J. Biol. Chem., **152**, 539(1944).
- (5) Kuttner, T. and Lichtenstein, L., J. Biol. Chem., **86**, 671(1930).
- (6) Fiske, C. H. and Subbarow, Y., J. Biol. Chem., **66**, 375(1925).
- (7) Sachett, G. E., J. Biol. Chem., **64**, 203(1925).
- (8) Ling, S. M., J. Biol. Chem., **76**, 361(1928).

第八章 尿的分析

尿的成分与体内物质代謝有密切关系。当代谢不正常时，尿的成分常有改变。因此，尿的分析在临床生化中和在代谢研究中都很重要。

尿中成分，有的在收集后，必须立即分析，有的可稍迟。尿酸及尿素的测定，应于当日进行，因尿酸易于沉淀，尿素可分解生成氨和二氧化碳。另外，肌酐也可变成肌酸。检查尿中是否有糖，应在3小时内进行。系统正规分析，应从24小时尿中取样。

实验五十八 尿酸的测定

24小时正常尿约含尿酸0.5—1.0克。患痛风症者，病发前尿酸排泄低，病发时则增高。白血病患者核蛋白分解较多，尿酸排泄也多。

尿中尿酸与砷磷钨酸作用，产生蓝色。测量颜色的深浅度，即可计算溶液中尿酸含量⁽¹⁾①。

器材 (1) 50毫升容量瓶；(2)微量滴定管；(3) 1毫升、10毫升吸量管；(4)光电比色计。

试剂 (1)砷磷钨酸试剂^[64](毒)；(2)5% NaCN溶液^[65](极毒！)；(3)标准尿酸溶液^[66](5毫升含有0.1毫克尿酸)。

操作 将尿稀释10倍至20倍(10毫升稀释尿约含尿酸0.15—0.3毫克)。取50毫升容量瓶，加稀释尿10毫升，5% NaCN5毫升(由滴管放入)，砷磷钨酸试剂(由滴管加入)1毫升。轻轻摇动。

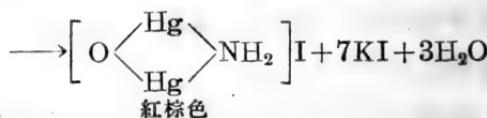
① 因为尿中含有与砷磷钨酸试剂反应产生颜色的其他物质，测得结果一般偏高。

放置 5 分钟后，加水至刻度并混匀。同时取尿酸标准溶液 10 毫升（含有 0.2 毫克尿酸）代替尿样品制备比色标准。用目視比色計或光电比色計比色。計算 24 小时尿中的尿酸含量。

實驗五十九 尿素的測定

尿素是哺乳动物、某些鱼类和某些两栖动物蛋白质代謝的重要产物。人每天由尿中約排出 10 克尿素氮，排出量受膳食中蛋白質含量的影响。吃高蛋白膳食后，排泄量高。腎和肝的功能状态对尿素排泄量也有影响。肝功能損害时，尿素形成受阻碍。腎功能損害时，则尿素排泄受阻碍。在以上两种情形下，尿中尿素排出量均减少。

在脲酶作用下尿中的尿素分解为氨和二氧化碳。氨和二氧化碳可结合成碳酸铵。生成的铵盐可以直接用 Nessler 氏試剂比色測定^①。尿中尿素排除量常以尿素氮来表示。



尿中含有铵盐。計算尿中尿素氮时，应从測得的氮量中减去尿中的铵氮。也可在測定尿素氮之前，先用硅酸鋁鈉离子交换剂 (permuitit) 将尿中原有的铵离子除去。

器材 (1) 100 毫升容量瓶；(2) 100 毫升錐形瓶；(3) 25 毫升、10 毫升、5 毫升、0.5 毫升吸量管；(4) 10 毫升量筒；(5) 小漏斗；(6) 濾紙；(7) 牛角勺；(8) 恒溫水浴鍋；(9) 比色計。

試劑 (1) 粉状硅酸鋁鈉 (permuitit 粉) 60 孔篩大小；(2) 緩冲

① Harwood 用盐酸滴定尿素分解生成的碳酸铵⁽²⁾。

溶液^[67]; (3)脲酶溶液^[68]; (4)Nessler 氏試劑^[41]; (5)標準硫酸銨溶液(每毫升含氮 0.5 毫克)。

操作 取尿 10 毫升, 在容量瓶內稀釋至 100 毫升。向干的 100 毫升錐形瓶中, 量入稀釋尿 15 毫升。添加硅酸鋁鈉粉 2 克^①。搖蕩 5 分鐘後, 靜置使硅酸鋁鈉粉沉降。通過干濾紙和干漏斗濾入干的錐形瓶內。注意保存已用過的硅酸鋁鈉粉, 以便回收。

將濾液 0.5 毫升、水 5 毫升、脲酶溶液 5 滴和緩衝溶液 3 滴量入 100 毫升容量瓶。另外用 5 毫升標準硫酸銨溶液代替 0.5 毫升尿濾液配制比色標準。脲酶溶液和緩衝溶液等均照加。兩瓶同時放在 50°C 恒溫水浴中, 隨時搖動。30 分鐘後取出, 各加水至約 75 毫升。從量筒中迅速地一次加入 Nessler 氏試劑 10 毫升, 搖勻, 再以水稀釋至 100 毫升。5 分鐘後比色。計算 24 小時尿中排除的尿素氮。

實驗六十 尿中病理成分的檢查

正常尿不含蛋白質和糖, 其膽色素和酮體含量也很低。腎臟病患者尿中常有蛋白質。嚴重糖尿病患者尿中有糖, 酮體含量也增加。肝炎病人和患膽管堵塞病人尿中膽色素含量增多。

器材 (1)試管; (2)量筒。

試劑 (1)濃 NH₄OH; (2)濃醋酸; (3)濃硝酸; (4)(NH₄)₂SO₄粉末; (5)亞硝基鐵氰化鈉溶液; (6)蛋白質及糖定性實驗中之試劑。

操作 (1)蛋白質之檢驗: 取 5 毫升尿, 裝入試管中, 在尿的上部加熱。如有沉淀發生, 可能為凝結蛋白質或磷酸鹽類。磷酸

① Na₂Al₂Si₂O₃ + 2NH₄⁺ $\xrightleftharpoons[\text{碱性}]{\text{中性或酸性}} \text{(NH}_4\text{)}_2\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_3 + 2\text{Na}^+$

盐类溶于醋酸。加濃醋酸 1—2 滴，若仍有混浊現象，即证明有蛋白质。

(2) 糖之檢驗：应用糖定性反應知識，檢查尿样品中有无葡萄糖。

(3) 胆色素之檢驗：加 3 毫升濃硝酸于試管中，小心地加上 3 毫升尿，勿令二液混合。如有胆色素存在，其接触面显示各色环，如綠、藍、紫、紅、黃等。

(4) 酮体之檢驗：置 5 毫升尿于試管中，加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末，使饱和，再加 3 滴新配制的亚硝基铁氰化鈉溶液 $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6\text{NO}]$ 。将濃 NH_4OH 輕輕加入管內。接触面上如有紅紫色环出現，即证明有丙酮存在。放置半小时后，再行观察。如含量甚微，所需時間較长。

参考书目

- (1) Benedict, S. R. and Franke, E., J. Biol. Chem., **52**, 387 (1922).
- (2) Harwood, J. A., Bull. Inst. Med. Lab. Technology, **15**, 41 (1950).

附 录

实验室規則

1. 实驗預习：在每次实验之前，必須对实验內容进行預习。預习应做到了解实验的目的、原理和操作步驟，懂得每一操作步驟的意义和需用的仪器的使用方法。这样，可以避免忙乱和浪费时间，并可保证实验順利进行及获得正确結果。教員可以在实验开始时，抽查学生对实验的預习情况。只有达到了預习的要求，才准进行实验。

2. 实验报告：实验观察和結果，須随时记录在实验报告紙上。文字要简单准确。报告形式可以使用图表。实验終了时，由班长汇交。

3. 整洁：清潔、整齐，为工作的必要习惯，极应养成。实验台上和櫈內务須洁淨，放置仪器、药品要有次序。不需要的仪器、药品，不要放在实验台上，以免妨碍操作。勿使試剂药品洒在桌面和地上。实验完毕，須将試剂药品排列整齐，将仪器洗淨收起，并将桌面抹拭干淨，方得离开实验室。

4. 仪器的洗涤：普遍玻璃仪器，如燒瓶、燒杯、試管等，用水和肥皂或去污粉洗刷即可。定量玻璃仪器，如滴定管和吸量管等，必要时可先用鉻酸洗液浸泡过夜，再用水冲淨，倒置架上，使水自行流出，不能用抹布擦拭里面。肥皂与洗液不能同时使用！滴定管玻塞上如有凡士林，在用鉻酸洗液浸泡以前，先将凡士林擦去。若非急用，勿用酒精或乙醚冲洗仪器。

鉻酸洗液的配制方法：取重鉻酸鉀 5 克置于250毫升燒杯中，

加水 5 毫升，搖蕩，尽量使其溶解。慢慢加入濃硫酸 100 毫升，隨加隨搖。冷却后，儲存于一玻璃广口瓶內，蓋緊蓋子以防吸水。

5. 烟雾和臭气处理：凡发生烟雾，有毒气体和有臭味气体的实验，均应在通風橱內进行。橱門应紧閉，非必要时勿开。

6. 氨气处理：在生物化学实验中，常作氨的定量測定。含氨溶液須在另室存放，以免影响实验結果。

7. 廢物的处理：廢弃液体可倒入水沟內，并放水冲走。强酸溶液須先用水稀釋，然后倒入廢品缸內。滤紙、火柴头、其他固体廢物和带有渣滓沉淀的廢液均应倒入廢品缸內。

8. 本生灯：燃灯时，先将火柴划着。一手执火柴近灯口，一手慢开煤气門。切勿先开气門，后燃火柴。熄灯时，关闭气門，火焰自灭。灯焰大小和火力强弱，須根据实验需要来調節。用大火焰維持少量开水沸騰，显然造成浪費。

9. 溫箱和冰箱：溫箱和冰箱的門必須严密。取放物件时，应随手关门。在溫箱和冰箱內存放仪器、药品，必須注明存放人姓名。

10. 珍貴仪器：天平、比色計、离心机等珍貴仪器，应重視爱护。使用前，应熟知使用方法。若有問題，随时請指导实验人員解答。

11. 实驗动物：进行实验时，不要戏弄动物。执行杀死解剖等操作，必須按照規定方法进行。

12. 厉行节约：使用仪器、药品和动物，必須注意节约。不要使用过量药品和試剂。不要在滤紙上記数据。使用动物时，同学間先互相联系，一个动物的不同部分常可供不同小組使用。因操作不仔細而造成的实验重复，也是浪费。避免损伤仪器。这样，不但有利节约，还可培养实验耐心和訓練技巧。

13. 試剂和标准溶液：取用后，須立刻将瓶塞严，放回原处。量取有毒試剂时，須用滴定管或量筒，切勿使用吸量管。自瓶中取出的試剂和标准溶液，如未用尽，切勿倒回瓶內，以免掺混。

14. 碱性溶液的存裝：勿用帶玻璃塞的玻璃瓶存裝氫氧化鈉、氫氧化鉀、氨水和碱性溶液。如必須用帶玻璃的滴定管盛裝碱性試劑，用毕应立即洗去。

15. 火險：勿令酒精、乙醚等易燃液体接近火焰。蒸餾易燃液体要使用水浴，用电炉加热，不可用火焰燒煮水浴。更不可直接用火焰加热。遇有火險，先关闭煤气門，再用沙土和灭火器灭火。若衣服着火，用水澆或就地一滾。

实验基本操作和实验室常識

(一)攪拌和振蕩

1. 配制溶液时，必須随时攪拌或振蕩混合。配制完了时，必須充分攪拌或振蕩混勻。

2. 攪拌使用的玻璃攪棒必須兩头都燒圓滑。

3. 攪棒的粗細长短，必須与盛器的大小和所配制溶液的多少呈适当比例关系。不能用长粗攪棒攪拌小离心管中的少量溶液。

4. 攪拌时，尽量使攪棒沿着器壁运动，不攪入空气，不使溶液飞濺。

5. 傾入液体时，必須沿器壁慢慢傾入，以免有大量空气混入。傾倒表面張力低的液体（如蛋白质溶液）时，更須緩慢仔細。

6. 振蕩溶液时，应沿着圓圈轉動盛器，不应上下振蕩。

7. 振蕩混合小离心管中液体时，可将离心管握在手中，以手腕、肘或肩作軸来旋轉离心管。也可由一手持离心管上端，用另一手彈动离心管。也可用一手大拇指和食指持管的上端，用其余三个手指彈动离心管。手指持管的松緊度要随着振动的幅度变化。还可以把两手掌合攏，夹住离心管，来回搓动。

8. 在量瓶中混合液体时，应倒持量瓶搖動，用手心頂住瓶塞，并不時翻轉量瓶。

9. 在分液漏斗中振荡液体时，应用一手在适当斜度下倒持漏斗，用手心顶住瓶塞，并用另一手控制漏斗活塞。一边振荡，一边开动活塞，使任何气体随时由漏斗泄出。
10. 研磨配制胶体溶液时，要使杵棒沿着乳鉢的单方向进行，不要来回研磨。

(二) 吹制玻璃仪器的基本动作

1. 許多玻璃仪器均由玻璃管吹制而成。吹制时，左手手背向上，右手手背向下，主要由左手轉动玻璃管，右手起支架作用。
2. 必須把玻璃燒軟、燒勻后，再行吹拉。
3. 吹拉玻璃要离开火焰后进行。
4. 吹拉玻璃时，都要不停地轉动，以抵銷重力影响。
5. 弯玻璃管时，必須随吹随弯。
6. 吹时，要連續用小口气，使薄处有先冷却的机会。

(三) 实驗室常識

1. 挪动玻璃仪器时，勿使手指接触仪器内壁。
2. 不要用量瓶作盛器。量瓶是量器。量瓶等带有磨口玻璃塞的仪器的塞子不要盖錯。带玻璃塞的仪器和玻璃瓶等，如果暂不使用，用紙条把瓶塞和瓶口隔开。
3. 洗淨的仪器要放在架上或干淨抹布上凉干。不能用抹布擦拭，特別不能用抹布擦拭仪器内壁。
4. 不用棉花代替橡皮塞或木塞塞堵瓶口或試管口。
5. 不用紙片复盖燒杯和錐形瓶等。
6. 不要用滤紙称量药品，更不能用滤紙作記錄。
7. 不要用石蜡封閉精細药品瓶口，以免掺混。
8. 使用鉛筆在玻璃仪器磨玻璃处写标记。如用蜡笔，则在亮

玻璃上写。

9. 药瓶换装其他药品时，不能在旧标签上写新药名称，也不能在签上贴签。一定洗去旧标签，换贴新标签。

10. 不能用石膏涂封蒸馏装置。

容量仪器使用法

1. 容量仪器有装量和卸量两种。某些量瓶和单刻度微量吸量管为装量仪器。滴定管、一般吸量管和量筒等，均为卸量仪器。卸量量瓶比较少见。

2. 吸量管有单刻度和多刻度两种。单刻度吸量管亦称移液管，多刻度吸量管也简称为刻度吸量管。单刻度吸量管有普通和奥氏两种。多刻度吸量管有血清吸量管和莫氏吸量管两种。

3. 用普通单刻度吸量管卸放液体时，须将管尖靠紧受纳器内壁，使液体自行流出。流完后，使管尖在受纳器壁上停留3—5秒钟，同时转动吸量管。遗留在管尖内的少量液体任其自然，不要吹出。使用奥氏吸量管时，必须将遗留在管尖中的少量液体吹入受纳器内。奥氏吸量管有0.5、1.0、2.0和3.0毫升数种，比普通单刻度吸量管准确，常作定量实验使用。某些奥氏吸量管带有玻璃塞。

4. 血清吸量管刻度至尖端。卸放总量时，遗留在尖端的少量液体不须吹出。莫氏吸量管总量刻度在尖端以上。卸放液体时，按照刻度进行。

5. 读吸量管刻度时，应背对光线，眼睛和刻度划线在同一水平上。

6. 容量仪器上的刻度，为一般定量实验使用，足够准确，无须重新校订。

7. 一般容量仪器的容积均在20°C下校准。使用时，如温度差

异在 5°C 以内，容积改变不大，可以略去不计。

分析天平的使用和保护

分析天平为一种精密仪器，极易由于不正确的使用而遭受损坏。使用前，熟记下列事项。

1. 保持砝码和天平内外绝对清洁。
2. 每次使用前，检查天平位置是否平衡，并校对零点。如零点距离中点过远，必须校正后再用。
3. 在移动或更换盘上载物、砝码和梁上游码时，必须先将天平横梁架起，将称盘托稳。架梁托盘和添减砝码等动作必须轻巧，勿使天平遭受任何剧烈振动。架梁须俟指针摆到零点左右时进行。
4. 称重时，须先放盘托，再放梁架。注意勿使天平摆动幅度过大。
5. 被称量的物品必须放在表面皿上或称量瓶内，不可直接放在天平盘上。称量能腐蚀金属并有挥发性质的药品时，必须在带盖的称量瓶中称量。其他吸水、吸氧、吸二氧化碳和能挥发的物质，也必须装在带盖的称量瓶内称量。
6. 称量液体物品时，须特别小心。勿滴洒在天平内、天平盘上和砝码上。
7. 被称量物品和砝码必须尽量放在称盘的中央。
8. 被称量的物品和盛器的温度必须和天平室的室温接近。
9. 必须用带有骨制摄头的小摄子移动砝码和游码，不可用手。砝码上如有灰尘，可用驼毛刷轻轻拂拭。不能用抹布和任何溶剂洗刷砝码。
10. 称量完毕后，支起天平横梁，并将称盘托稳。游码必须挂起，并将砝码顺序放回砝码盒内。
11. 砝码重量可在天平盘上检数一次。放入砝码盒中的空格

时，再检数一次。

12. 离开天平前，全面检查一遍。最后关严玻璃门并套上布罩。

13. 使用中如发生障碍或意外，应立即通知教员或实验员。不要自行检修。

离心机的使用

欲使沉淀与母液分开，有过滤和离心两种方法。有下列情形者以离心为宜。（1）沉淀有粘性；（2）沉淀颗粒小，容易透过滤纸；（3）沉淀之量多而松；（4）沉淀之量很少而需要定量测量；（5）母液粘稠；（6）母液量很少，分离时应减少损失；（7）沉淀和母液必须迅速分开；（8）一般胶体溶液。

离心机有手摇式和电动式两种。使用时，应注意下列事项。

1. 离心机上的对称双耳环，重量须相等。
2. 对称的金属套管或金属套杯和玻璃离心管或离心瓶的重量与式样须相近似。
3. 套管或套杯内须放橡皮垫。
4. 套管或套杯和离心管或离心瓶之间须装水缓冲，以免互碰破碎。
5. 对称的金属套管或套杯，连同离心管或离心瓶，管内或瓶内内容物和缓冲用水的总重量必须相等。离心前，必须在普通天秤上平衡。如不相等，可调整对称离心管内内容物的量或缓冲用水的量。
6. 离心所需速度的高低和时间的长短，以沉淀性质为转移。高速度短时间的离心效果较低速度长时间的离心效果好。但不可无限制地追求速度，以免发生危险。
7. 如用电动离心机，必须将盖子盖严。开动时，先开电门，然后搬动电阻，使速度慢慢增加。

8. 在轉動時，離心機機身應穩，聲音均勻。否則，表示對稱離心物件重量不等。如發現玻璃離心管瓶破碎，須立即停止離心，小心清除玻璃碎屑。

9. 停止離心時，須先關電門，然後將電阻撥至零位（最大電阻位置），使離心機自行停止。不能用手強制離心機停止運動，否則，沉淀被攪動浮起，而離心機也容易受損傷。

10. 勿使帶有緩衝用水的套管或套杯在離心機內長期懸挂。以免離心機件損壞。

光電比色計的原理和使用

以待測物已知濃度的顯色溶液為標準，比較未知濃度顯色溶液的透光度來測定其濃度的方法為比色法。比色法的靈敏度常超過重量分析法和容量分析法，是生物化學實驗中常用的一種定量分析方法。其操作過程也較簡便。

一、簡單原理：

有色溶液的透光度決定於：

1. 有色物質的性質；
2. 溶液的厚度；
3. 溶液的濃度；
4. 單色光的波長。

根據比耳(Beer)定律，當光波接近於單色光時，其透光度為：

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-KLC} \quad (1)$$

I_0 是入射光強度； I 是透射光強度； $\frac{I}{I_0}$ 為透光度（有人用 T 來代表）； L 為溶液的厚度； C 為溶液的濃度； K 為常數（與溶液性質有關）。

取式(1)中的兩項對數，則得：

$$\log \frac{I}{I_0} = -KLC \text{ 或 } \log \frac{I_0}{I} = KLC \quad (2)$$

$\log \frac{I_0}{I}$ 称为光密度, 可以用 D 表示。

$$\log \frac{I_0}{I} = D = KLC \quad (3)$$

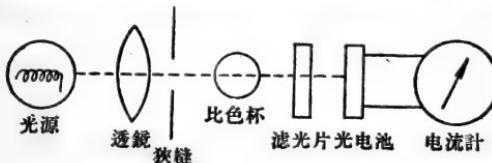
从式(3)中可以看出, 在单色光的情况下, 光密度与有色物质的浓度成正比(当溶液浓度在一定范围内)。若已知某有色溶液浓度为 C , 光密度为 D , 待测液浓度为 C_x , 光密度为 D_x , 两种溶液的厚度相等, 均为 L , 则可按下列关系式求出待测液浓度。

$$D = KLC \quad D_x = KLC_x$$

$$\frac{D}{D_x} = \frac{C}{C_x}$$

$$\therefore C_x = \frac{D_x}{D} \cdot C \quad (4)$$

利用光电管将光能轉变成电能, 根据电流强度比較光的强弱來設計的比色仪器, 称为光电比色計。附图是单光电池比色計的示意图, 光經過透鏡、固定的狭縫(都是相当寬的)、比色杯和滤光片



单光电池比色計示意图。

照射到光电池上时, 电流計的指針就偏斜。先在比色杯中装空白样品, 再将指針調节到光密度为零。調节的方法很多, 如減低光源的亮度(用电阻); 加大或縮小狭縫(虹彩光圈); 或在光电池与电流計之間加电阻調节之。后者是最常用的方法。用光电比色計可以測出已知和未知濃度溶液的光密度, 然后从式(4)中求出未知溶液濃度。

为了满足 Beer 定律所需的条件，应当使用单色光源，实际上是使用某一定波长单色光的滤光片。选择滤光片的原则是：滤光片透光度最大的光波是溶液透光度最小(或吸收最大)的光波。在大多数情况下，最合适的选择是溶液的补色。选择滤光片时可参考下表。

波 长 (毫微米)	溶 液 的 颜 色	滤 光 片 的 颜 色
400—435	青紫	綠色帶黃
435—480	藍	黃
480—490	藍色帶綠	橘紅
490—500	綠色帶藍	紅
500—560	綠	紫
560—580	綠色帶黃	青紫
580—595	黃	藍
595—610	橘紅	藍色帶綠
610—750	紅	綠色帶藍

二、光电比色计的操作要点及注意事项(以上海科伟仪器厂出品的 581 型光电比色计为例)。

1. 操作要点：

(1) 检查电源开关是否断路，旋转粗细调节到零位置，然后接通电源。

(2) 选择合适滤光片，插入比色槽旁细缝内。

(3) 转动电源开关至“1”，旋转零点调节器，使电源指针指示透光为零处。在测定过程中零点调节器位置固定不变。

(4) 在盛有空白液和待测液(已知及未知浓度的溶液)的比色杯分别放入比色槽内，盖上盖子。将装有空白液的比色杯推入光路中。

(5) 将电源开关撥至“2”，电源灯即明亮。經數分钟电流恒定后，轉动粗細調節器，使电流指針指示透光度为 100 处(光密度为零处)。

(6) 移开空白杯，将待測液的比色杯推入光路中。此时电流指針指示之讀数即为待測液之光密度值。

(7) 重复讀数 2—3 次，取平均讀数。

(8) 每次測完后，将电源开关撥至“1”处，再更換待測液。

(9) 比色完毕，关闭电源开关，并恢复粗細調節器到零点位置。

(10) 測定時間如需超过 30 分钟，应使仪器休息 10 分钟后再使用。

2. 注意事項：

(1) 装入待測液或空白液时，必須达到比色杯 2/3 左右(約装 4.5—6 毫升)。若不慎倒出，务必用滤紙吸干比色杯，再用揩鏡紙揩干后，才能放入比色槽內。

(2) 不要用手、滤紙、毛刷等擦拭比色杯的光滑面，以免损坏和磨毛。

(3) 用完比色杯后，立即用自来水冲洗，再用蒸餾水洗净。洗净后，可将比色杯倒置晾干，或用滤紙先将水分吸掉，再用揩鏡紙輕輕揩干。

(4) 比色計应防止强烈光照，暂时不用时，可将开关撥至“1”。不用时，应撥至“0”处。使用或檢查时，須插滤光片，以保护光电池。

(5) 比色計不能随意挪动，以防止震坏微型电流計。

(6) 比色計內干燥袋(內装硅胶)須經常檢查，如发现硅胶变藍，必須更換(变藍的硅胶經烘干至无色后，仍可使用)。

(7) 如較長時間使用比色計，須按操作要点的規定，給仪器以适当的休息。

試劑的配制

[1] Molisch 氏試劑：取 α -萘酚 2 克溶于 95% 酒精稀釋至 100 毫升。臨用前新配。

[2] Seliwanoff 氏試劑：取間苯二酚 0.05 克溶于 50 毫升濃鹽酸內，再用水稀釋至 100 毫升。

[3] Tollen 氏試劑：取 20% 間苯三酚的 95% 酒精溶液 30 毫升，加濃鹽酸 150 毫升，用水稀釋至 270 毫升。

[4] Bial 氏試劑：取 1.5 克甲基間苯二酚（地衣酚）溶于 500 毫升濃鹽酸，並加入 20—30 滴 10% 三氯化鐵。

[5] Fehling 氏試劑：

試劑 A（硫酸銅溶液）：將 34.5 克硫酸銅結晶 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 溶于 500 毫升蒸餾水中。

試劑 B（酒石酸鉀鈉鹼性溶液）：將 125 克氫氧化鈉和 137 克酒石酸鉀鈉（Rochelle 盐）溶于 500 毫升水。貯于帶橡皮塞的瓶內。

臨用時，將試劑 A 與試劑 B 等量混合。

[6] Benedict 氏試劑：將無水硫酸銅 17.4 克溶解于 100 毫升熱水中。冷後，稀釋至 150 毫升。取檸檬酸鈉 173 克及無水碳酸鈉 100 克，加水 600 毫升，加熱使之溶解。溶液如不清亮，過濾。冷後，稀釋至 850 毫升。最後把 $CuSO_4$ 溶液傾入檸檬酸鈉-碳酸鈉溶液中。混勻後，用狹口瓶貯存。此試劑可保存很久。

[7] Barfoed-Tauber-Kleiner 三氏試劑：將醋酸銅 48 克溶解于 900 毫升沸水中。若有沉淀，不必過濾。在熱溶液中立即添加 8.5% 乳酸 50 毫升。搖勻，待所有沉淀幾乎溶盡後，稀釋至 1,000 毫升，並過濾。

[8] 磷鉬酸試劑：在燒杯中，加入 150 克純的鉬酸和 75 克無水碳酸鈉，逐漸加水並搖動（約 500 毫升），加熱至沸，使全部鉬酸

溶解，滤去不溶物（很少）。在滤液中加入 300 毫升 85% 磷酸，冷却，冲稀至 1,000 毫升。

[9] 盐酸苯肼-醋酸钠混合物：取苯肼盐酸 2 份，醋酸钠 3 份，于乳鉢上研混即得。苯肼在空气中不稳定，因此，通常用較稳定的苯肼盐酸盐。因为成脎反应必須在弱酸性溶液中进行，使用时，須加入适量的醋酸钠以緩冲盐酸的酸度。所用醋酸钠也不能过多。

[10] 血液：可用 Francke 氏針刺破手指，用 0.1 毫升吸量管直接吸取。如用动物全血，则必須用氟化鈉作抗凝剂。氟化鈉同时可以抑制血糖的酵解。在一干燥試管內加入适量的氟化鈉粉末（每毫升血液加 5 毫克），使动物血直接流入試管內，隨流隨搖，使与氟化鈉混合。放冷处或冰箱中保存备用。

[11] 0.005N 标准铁氰化钾碱性溶液：用分析天平称取純铁氰化钾 1.65 克。用蒸餾水在 1,000 毫升量瓶內溶解后，添加預先在白金坩堝（也可用瓷坩堝）中煅燒过的无水碳酸鈉 10.60 克。最后加蒸餾水稀釋到刻度。将溶液倒入蒸汽洗过的带色瓶內，并放在阴暗处保存。可保存两个月。

注意：純鐵氰化鉀中不应含有 Fe^{+++} 和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 离子，可用下法鉴定：

Fe^{+++} 試法：取 5% 铁氰化鉀溶液 5 毫升，加 10% 硫酸及亚铁氰化鉀各一滴。如有 Fe^{+++} 存在，则呈藍色。灵敏度，0.01 毫克 Fe^{+++} 。

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 試法：取 5% 铁氰化鉀溶液 1 毫升，加新配制的 1% 三氯化铁溶液和 1N 盐酸各数滴。有 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 存在时，则呈藍色。灵敏度，0.02 毫克 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 。

若铁氰化鉀不純，可依下法进行重結晶。先用冷蒸餾水冲洗铁氰化鉀，再用热水溶解成饱和溶液。趁热用水洗过的滤紙滤入蒸发皿中，在冰箱中放置过夜，使之結晶。在布氏漏斗上抽滤結晶，

最后放入 50°C 烘箱内烘干。用棕色玻璃瓶储存备用。

[12] 氯化物-硫酸锌-碘化钾溶液：将硫酸锌 50 克和氯化钠 250 克溶于水中，稀释到 1,000 毫升。使用时，再在每 200 毫升溶液中溶解碘化钾 5 克。

[13] 0.005N 标准硫代硫酸钠溶液：将 50 毫升 0.1N 标准硫代硫酸钠溶液（见试剂配制法 16）稀释到 1,000 毫升。临用前新配。

[14] 0.5N 氢氧化钠酒精溶液：溶解约 20 克 NaOH 于 40 毫升水中，再将此氢氧化钠溶液慢慢地加入 960 毫升 95% 酒精中，即得 0.5N 氢氧化钠酒精溶液。

[15] Hanus 氏溶液：取 12.2 克碘，放入 1,500 毫升锥形瓶内，徐徐加入 1,000 毫升冰醋酸(99.5%)，边加边摇，同时略加温热，使碘溶解。冷却，加溴约 3 毫升。

注意：所用冰醋酸不应含有还原物质。取 2 毫升冰醋酸，加少许重铬酸钾及硫酸。若无绿色呈现，则证明无还原物质存在。

[16] 0.1N 标准硫代硫酸钠溶液：将结晶硫代硫酸钠 50 克，溶在经煮沸后冷却的蒸馏水中（无 CO₂ 存在）。添加硼砂 7.6 克或氢氧化钠 1.6 克。（硫代硫酸钠溶液在 pH9—10 最稳定）。稀释到 2,000 毫升后，可用标准 0.1N 碘酸钾溶液按下法标定：

准确地量取 0.1N 碘酸钾溶液 20 毫升与 10% 碘化钾溶液 10 毫升和 1N 硫酸 20 毫升混合。以 1% 淀粉溶液作指示剂，用硫代硫酸钠溶液进行标定。按下列反应式计算硫代硫酸钠溶液浓度后，用水稀释至 0.1N。



[17] 蛋白质溶液：除去卵黄的鸡蛋白与 19—20 倍容积的水混合后，通过数层纱布过滤。

[18] Millon 氏試劑：汞 40 克溶于比重 1.42 的濃硝酸 60 毫升中，在水浴上溫熱，幫助溶解。溶後，用 2 倍的蒸餾水稀釋之。待澄清後，取出上清液使用。

[19] 次溴酸鈉溶液：在冰冷却下，將 2 克溴溶于 100 毫升 5% 氢氧化鈉中。將溶液保存在棕色瓶內，并放在冷暗處。兩周內有效。

[20] Ehrlich 氏重氮試劑：

溶液 A：溶解 5 克亞硝酸鈉于 1,000 毫升蒸餾水中。

溶液 B：溶解 5 克磺胺酸 (α -氨基苯磺酸) 于 1,000 毫升水中。溶後，加入 5 毫升濃鹽酸。

將 A 和 B 兩溶液保存在密閉瓶內。需用時，以 1:50 比例配合。

[21] 蛋白質氯化鈉溶液：取 3 個雞蛋，除去卵黃，將雞蛋清與 700 毫升蒸餾水及 300 毫升飽和食鹽水混合後，通過數層紗布過濾。

[22] 碘化鉀-碘化汞溶液：將碘化鉀 5 克溶解于 50 毫升蒸餾水中。加碘化汞 12 克飽和之，並加蒸餾水至 100 毫升。

[23] 酪蛋白-乙酸鈉溶液：取純淨酪蛋白 0.25 克，盛于 50 毫升容量瓶內加入蒸餾水約 20 毫升，並準確地加入標準的 1N 氢氧化鈉 5 毫升。當酪蛋白溶解後，準確地加入標準的 1N 醋酸 5 毫升，加水稀釋至 50 毫升，充分搖勻。

[24] 中性甲醛溶液：取市售甲醛溶液蒸餾。取蒸餾液 45 毫升，加 0.5% 酚酞指示劑 3 毫升，再加 0.1N 氢氧化鈉溶液至呈淺粉紅色。使用前，重新進行中和。

[25] 猪血清：取猪血置離心管或離心杯內。放在冰箱中過夜後，離心除去血凝塊。上層清液即為血清。

[26] 混合指示劑：

(1) 把溶解于 95% 酒精的 0.1% 溴甲酚綠溶液 10 毫升和溶于 95% 酒精的 0.1% 甲基紅溶液 2 毫升混合而成。

(2) 可用田氏指示劑，由 50 毫升 0.1% 甲烯藍酒精溶液與 200

毫升 0.1% 甲基紅酒精溶液混合配成。酸性為紫紅色，碱性為綠色。变色范围很狭且灵敏。

[27] 双縮脲試劑：将 1.5 克硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和 6.0 克酒石酸鉀鈉溶于 500 毫升水中，在不断攪拌下，加入 300 毫升 10% 氢氧化鈉。稀釋至 1,000 毫升。

[28] 二苯胺試劑：将 4 克二苯胺溶于 400 毫升冰醋酸中，再加上 11 毫升濃硫酸(比重 1.84)。(如冰醋酸不純，試劑呈藍或綠色)。

[29] 鉬酸銨溶液(檢查磷酸鹽用)：将鉬酸銨($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2 克溶解在 100 毫升 10% 硫酸中。

[30] α -1, 2, 4-氨基萘酚磷酸原液：将 0.25 克 α -1, 2, 4-氨基萘酚磷酸，15 克亚硫酸氫鈉及 0.5 克亚硫酸鈉溶于 100 毫升水中。在使用前，取 1 体积原液，加 4 体积水。

[31] 精餾氯仿：用蒸餾水洗滌市售的純氯仿 2—3 次。加一些燒燬的碳酸鉀或无水硫酸鈉進行干燥，并在暗色玻璃燒瓶中蒸餾。

[32] 三氯化鎘氯仿飽和溶液：用少量精餾氯仿反復洗滌三氯化鎘，直到氯仿不再呈色為止。放在干燥器內，用硫酸干燥。用干燥的三氯化鎘和精餾氯仿配置飽和溶液。

[33] 重氮試劑(參考[20])：

溶液 A：将对-氨基苯磺酸 1 克溶解于 15 毫升濃鹽酸中，然后加水稀釋至 100 毫升。

溶液 B：将亞硝酸鈉 0.5 克溶解于水中，稀釋至 100 毫升。每次用前新配。

需用時，將溶液 B 3 毫升加入溶液 A 100 毫升中，混合即得。

[34] 碳酸氫鈉碱性溶液：氫氧化鈉 20 克溶于 600 毫升蒸餾水中，加碳酸氫鈉 28.8 克。混勻後，用水稀釋到 1,000 毫升。

[35] 尼克酸提取液: 取干酵母 10 克, 于乳鉢中研細, 把細末移入 125 毫升錐形瓶內, 加 0.1N 盐酸 50 毫升。將錐形瓶用手或放在电动震蕩机上搖动 1—2 小时。在室溫下放置过夜后, 过滤或离心, 除去固体杂质。

[36] Folin 氏試剂: 取 10 克鎢酸鈉, 2 克磷鉬酸, 5 毫升 85% 磷酸溶液和 75 毫升蒸餾水混合。加热迴流 2 小时。冷后, 加水稀釋至 100 毫升。

[37] 2, 6-二氯酚靛酚鈉溶液: 将 50 毫克 2, 6-二氯酚靛酚溶解于約 200 毫升含有 52 毫克碳酸氫鈉的热水中。冷后, 稀釋到 250 毫升。用靛色瓶盛裝, 并放在冰箱里(3°C)儲藏。2, 6-二氯酚靛酚不甚穩定, 每周必須重新配制, 每次使用前依下法标定:

取 5 毫升标准抗坏血酸溶液加 5 毫升 1% 草酸, 以 2, 6-二氯酚靛酚滴定呈粉紅色, 并在 15 秒钟內不退色为終点。計算 2, 6-二氯酚靛酚溶液的濃度。

标准抗坏血酸溶液: 溶解 100 毫克純抗坏血酸粉狀結晶于 1% 草酸中, 然后稀釋到 500 毫升。在使用前临时配制。

[38] 蔗糖酶溶液: 取干酵母 100 克, 置于乳鉢內, 添加适量蒸餾水及少量細沙。用力研磨提取約 1 小时, 再加蒸餾水, 使总体积約为 500 毫升, 过滤。将滤液保存于冰箱內备用。

[39] 碘化鉀-碘溶液: 将碘化鉀 20 克及碘 10 克溶于 100 毫升水中。使用前, 稀釋 10 倍。

[40] 脲酶提取液: 取黃豆粉 6 克, 加 30% 酒精 250 毫升, 振蕩 10 分钟, 过滤。可保存 1—2 星期。

[41] Nessler 氏試剂: 先将 30 克碘化鉀溶于 20 毫升蒸餾水中, 再加入 22.5 克碘, 并搖动使之溶解。溶后, 加純汞 30 克, 继續搖动, 直至上清液失去黃色为止。为防止溫度升高太多, 摆动时可用冷水冷却。傾出上层清液。

将清液数滴滴入1毫升1%淀粉溶液中。检查有无游离碘存在，如无蓝色出现，再添加以上10%碘溶液数滴，使清液与淀粉反应呈微蓝色。最后稀释成200毫升。混匀后，将所得液体全部倒入975毫升准确配制的10%氢氧化钠溶液中。均匀混和，静置使成澄清。

[42] 0.05% 酪氨酸溶液：准确地称取酪氨酸0.1克。在200毫升容量瓶中，加0.01N碳酸钠溶液约150毫升，使酪氨酸溶解。为了加快溶解，可将量瓶放在热水浴中微热。冷至室温后，稀释到刻度。每毫升溶液含0.5毫克酪氨酸。

[43] 愈创木脂酒精溶液：取愈创木脂1克，溶解于100毫升95%酒精中。

[44] 2%琼脂溶液：取2克琼脂，用0.5%磷酸氢二钾溶液加热溶解。调节pH到7。使用前，在沸水浴上溶化，并冷却至45°C。

[45] 肌肉糜：用重物击头杀死动物（鼠或兔），迅速将血放尽。取背部及腿部肌肉，在低温处，用剪刀剪成碎块，并在乳钵中磨碎。使用前制备。

[46] 白菜提取液：取白菜叶约5克，置于乳钵内磨碎。加蒸馏水15毫升，搅匀后过滤。

[47] 酸性鸡蛋清蛋白溶液：将80毫升2%卵清蛋白溶液与20毫升0.03N盐酸溶液混合均匀。

[48] 醋酸盐缓冲溶液，pH=4.0：将164毫升0.1N醋酸溶液与36毫升0.1N醋酸钠溶液混合。

[49] 新鲜肌肉提取液：以铁锤击头杀死动物（大白鼠或家兔），将血放尽。迅速取下背部及腿部肌肉，置于乳钵内，用剪刀剪碎。添加约4倍于肌肉重量的生理盐溶液。仔细磨成匀浆。30分钟后，用浸湿的麻布或4层纱布过滤。将滤液保存于冰箱内。提取液必在实验当天配制。

[50] Locke 氏溶液: 將氯化鈉 0.9 克, 氯化鉀 0.042 克, 氯化鈣 0.024 克, 碳酸氫鈉 0.015 克和葡萄糖 0.1 克溶于水中。稀釋至 100 毫升。

[51] 0.5N 丁酸溶液: 取 45 毫升正丁酸, 用 1N 氢氧化鈉中和至 pH=7.6, 并稀釋至 1,000 毫升。

[52] 0.1N 碘溶液: 称取 12.7 克碘和約 25 克碘化鉀, 放入 1,000 毫升量瓶中, 加水溶解。溶解后, 稀釋至刻度。混勻。用標準 0.1N 硫代硫酸鈉標定。

[53] 丙酮酸鈉標準液(2.0 微克分子/毫升): 取分析純丙酮酸鈉 11 毫克溶解于 50 毫升磷酸緩衝液內(此溶液不能久置, 每次做標準曲線時, 宜當日新鮮配制)。

[54] 谷丙轉氨酶底物: 取分析純 α -酮戊二酸 29.2 毫克, DL-丙氨酸 1.78 克置于小燒杯內, 加 1N NaOH 約 10 毫升至完全溶解。用 1N 氢氧化鈉或 1N 盐酸校正其 pH 至 7.4。加磷酸緩衝液稀釋至 100 毫升。然后加氯仿數滴防腐。在冰箱內可保存一周。此溶液每 1.0 毫升含 α -酮戊二酸 2.0 微克分子, 丙氨酸 200 微克分子。

[55] 2,4-二硝基苯肼溶液: 將分析純 2,4-二硝基苯肼 19.8 毫克稱入 200 毫升錐形瓶內, 加 100 毫升 1N 盐酸。2,4-二硝基苯肼溶解較慢, 把錐形瓶放在暗處不時搖動。待全部溶解後, 濾入褐色玻璃瓶, 并置冰箱中保存。

[56] 谷氨酸溶液: 取谷氨酸 1.47 克, 溶于 100 毫升 1% 碳酸氫鉀溶液中。

[57] 酚溶劑: 取新蒸餾的無色苯酚 2 份和蒸餾水 1 份(按重量計算), 放入一大一小合適的分液漏斗中。振蕩混合, 使成乳狀液。靜置 7—10 小時, 俟其分成兩層後, 放出下層使用。

[58] 亞硝酸鈷鈉溶液: 將 25 克晶体硝酸鈷 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 溶于 50 毫升水中, 加 12.5 毫升冰醋酸, 混勻。另將 120 克亞硝酸

鈉溶于 180 毫升水中(其体积約为 220 毫升)。量取 210 毫升与以上配制的硝酸鈷溶液混合。用空气将混合溶液中的氧化氮气体吹淨，放在冰箱內保存。临用前过滤。

[59] 0.2N 草酸鈉溶液：在称量瓶中准确地称取干燥过的草酸鈉粉末 0.67 克，用水冲洗入 500 毫升量瓶內。溶解后，稀釋至刻度并混匀。放在冰箱內保存。

[60] 0.02N 高錳酸鉀溶液：称取晶体高錳酸鉀約 3.25 克，放入 1.2 或 2 升大燒杯內。加蒸餾水約 1,000 毫升，慢慢加热并攪拌，使之溶解。冷却后，經石棉过滤。此高錳酸鉀溶液的濃度約为 0.1N。

准确地量取 25 毫升 0.02N 草酸溶液，加 2 毫升硫酸溶液，混匀后加热煮沸。趁热用以上的高錳酸鉀溶液滴定。算出高錳酸鉀溶液濃度后，用冷的新煮沸过的蒸餾水稀釋到 0.02N。

[61] 1:2 亚硝酸鈉溶液：以 100 毫升的水溶解 50 克 NaNO_2 。

[62] 鉑酸銨溶液：将 25 克純鉑酸銨溶于 300 毫升蒸餾水中。另将 75 毫升濃硫酸加入約 100 毫升蒸餾水中，隨加隨攪拌。冷后，稀釋到 200 毫升，最后将以上稀硫酸溶液加入鉑酸銨溶液中。混匀后，存放暗处。

[63] 标准磷酸溶液：在称量瓶中准确地称取 0.0438 克干燥的磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)。用水冲洗入 1,000 毫升量瓶內。溶解后，稀釋到刻度。此溶液每毫升含有 0.01 毫克磷。

[64] 砷磷鎢酸試劑：取 100 克鎢酸鈉 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 置 1,000 毫升燒瓶中，加水 600 毫升使溶解，再加純五氧化砷 50 克，85% H_3PO_4 25 毫升，濃盐酸 20 毫升。煮沸 20 分钟。冷却后，稀釋至 1,000 毫升，此液可长久保存。

[65] NaCN 溶液：配成 5% NaCN ，每 100 毫升加濃 NH_4OH 2 毫升。配妥后，2—3 星期内可用，久則不能使用。注意 NaCN 为剧

毒!

[66] 标准尿酸溶液: 取一 500 毫升量瓶, 以水 200 至 300 毫升溶解结晶磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)9 克及结晶磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)1 克。如不清亮, 过滤, 再用热水稀释至 500 毫升。准确地称尿酸 200 毫克, 置 1,000 毫升量瓶内, 加水少許, 将上面的热磷酸盐溶液倒入, 混合之, 使尿酸完全溶化。冷却后, 加冰醋酸 1.4 毫升, 再加水至刻度。加氯仿 5 毫升混匀防腐。此液 5 毫升含有 1 毫克尿酸。使用前, 取此液 10 毫升, 置 500 毫升容量瓶中。加水 400 毫升 11:9 稀 HCl 25 毫升, 再稀释至刻度。混合均匀。每 10—14 日須重新配制一次。

[67] 缓冲溶液: 在 100 毫升容量瓶中, 用 75 毫升水溶解结晶草酸钠 15 克, 添加冰醋酸 1 毫升。然后稀释至 100 毫升。

[68] 脂酶溶液: 称硅酸铝钠粉 3 克以 3% 醋酸冲洗一次, 再以水冲洗两次。加細刀豆粉 5 克及 15% 酒精 100 毫升, 輕輕搖蕩 10—15 分钟。放置半小时, 間或搖蕩, 用細濾紙過濾。過濾時用玻罩將濾器蓋上, 以防蒸發。

[69] 磷酸盐溶液: 取 60 克磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和 20 克磷酸二氢钾(KH_2PO_4)溶解于水中, 稀释至 1,000 毫升。

[70] 生理盐溶液: 将 4 毫升 1.15% 氯化钾溶液, 3 毫升 0.11 M 氯化钙溶液, 1 毫升 0.154M 硫酸镁溶液和 21 毫升 0.1M 磷酸氢二钠溶液(用 0.1N 盐酸中和到 $\text{pH}=7.3$)混合。混合后, 稀释至 10,000 毫升。檢查并調節 pH 到 7.3。

缓冲溶液及其配制

弱酸的解离程度服从质量作用定律。醋酸的解离关系如下, 1.86×10^{-5} 是醋酸的解离常数。

$$[\text{H}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-] = 1.86 \times 10^{-5} [\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$[\text{H}^+] = 1.86 \times 10^{-5} \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

从以上可知氢离子浓度决定于醋酸的解离常数与醋酸分子和醋酸根离子的比值。当增加醋酸根离子的浓度时，如加入醋酸钠，氢离子浓度则减少。因为醋酸钠几乎是完全解离的，而醋酸解离度很小，可以用醋酸钠的量代表溶液中醋酸根离子的量。所以醋酸与醋酸钠混合物的氢离子浓度决定于醋酸与醋酸钠的比值：

$$[\text{H}^+] = 1.86 \times 10^{-5} \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]}$$

如果我们忽略稀释时对于醋酸和醋酸钠解离的影响，那么以上公式说明，稀释不影响氢离子浓度。例如，10毫升由等体积0.1N CH_3COOH 和 0.1N CH_3COONa 混合的溶液稀释10倍后，其氢离子浓度改变不大。

由弱酸和弱酸强碱的盐的混合液，称为缓冲溶液。和酸或碱溶液相比，缓冲溶液在加入酸和碱时，更能保持氢离子浓度。

例如，0.005N CH_3COOH 和 0.1N CH_3COOH 与 0.1M CH_3COONa 各半的混合溶液的氢离子浓度相近似。如果向体积相等的这两种溶液各加入一些 0.01N HCl，第一溶液的氢离子浓度的改变比第二个溶液就大得多。

配制缓冲溶液的方案很多，以下是配制 pH 3.72—5.57 的 0.2M 醋酸缓冲液、pH 5.27—8.04 的 $\frac{M}{15}$ 磷酸缓冲液和 pH 7.8—10.0 的 0.2M 硼酸缓冲液的三种方案。

配制缓冲溶液用的重蒸馏水应预先在硬质玻璃烧瓶中煮沸，并在装有钠石灰和氯化钾管的瓶中储存。

0.2M 醋酸钠溶液(pH 3.72—5.57)：1M 醋酸溶液和不含碳酸盐的 1M 氢氧化钠溶液等体积混合，配制 0.5M 醋酸钠溶液，再稀释到 0.2M。

按照下表配制 pH 3.72—5.57 的 0.2M 醋酸缓冲溶液。

0.2M CH ₃ COOH	0.2M CH ₃ COONa	pH	0.2M CH ₃ COOH	0.2M CH ₃ COONa	pH
90	10	3.72	40	60	4.80
80	20	4.05	30	70	4.99
70	30	4.27	20	80	5.23
60	40	4.45	15	85	5.37
50	50	4.63	10	90	5.57

$\frac{M}{15}$ 磷酸缓冲溶液(pH 5.29—8.04): 称量 9.078 克 KH₂PO₄ 溶于重蒸馏水，在 1,000 毫升容量瓶中稀释到刻度。

$\frac{M}{15}$ Na₂HPO₄ 溶液: 称量 11.876 克 Na₂HPO₄·2H₂O (Sörensen 氏 Na₂HPO₄·2H₂O) 溶于重蒸馏水，在 1 升容量瓶中稀释到刻度。如无 Na₂HPO₄·2H₂O，可将新结晶的 Na₂HPO₄·12H₂O 在室温下空气干燥 2—3 星期，然后使用。

按照下表配制 pH 5.29—8.04 的 $\frac{M}{15}$ 磷酸缓冲溶液。

M/15 KH ₂ PO ₄	M/15 Na ₂ HPO ₄	pH	M/15 KH ₂ PO ₄	M/15 Na ₂ HPO ₄	pH
9.75	0.25	5.29	5.00	5.00	6.81
9.50	0.50	5.59	4.00	6.00	6.98
9.00	1.00	5.91	3.00	7.00	7.17
8.00	2.00	6.24	2.00	8.00	7.38
7.00	3.00	6.47	1.00	9.00	7.73
6.00	4.00	6.64	0.50	9.50	8.04

0.2M 硼酸缓冲溶液(pH 7.8—10.0): 用蒸馏水重结晶硼酸两次，并薄铺在纸上干燥。称取 12.405 克硼酸和 14.912 克氯化钾，用重蒸馏水溶解后，移入 1 升容量瓶中，并稀释到刻度。

0.2M 氢氧化钠溶液由饱和溶液标定配制。最后用重蒸馏水

稀釋至 0.2M。制备緩冲溶液时，准确地量取50毫升硼酸-氯化鉀溶液。按照下表添加 0.2M NaOH 溶液，并稀釋至 200 毫升。

M/5NaOH	pH	0.2MNaOH	pH	0.2MNaOH	pH
毫升		毫升		毫升	
2.61	7.8	12.0	8.6	32.0	9.4
3.97	8.0	16.3	8.8	36.8	9.6
5.90	8.2	21.3	9.0	40.8	9.8
8.50	8.4	26.7	9.2	43.9	10.0

計算公式

(这些計算公式为計算實驗結果时参考核对使用)

實驗八 粗脂肪的定量測定

$$\frac{A-B}{C} \times 100 = \text{粗脂肪 \%}$$

式中： A=提取瓶及粗脂肪共重；

B=提取瓶重量；

C=样品的重量。

實驗九 碘值的測定

$$\frac{(A-B)T \times 100}{C} = \text{碘值}$$

式中： A=滴定空白用去的硫代硫酸鈉溶液平均毫升数；

B=滴定样品用去的硫代硫酸鈉溶液平均毫升数；

C=样品重量；

T=与一毫升 0.1N 硫代硫酸鈉溶液相当的碘的克数；

$$T = \frac{0.1 \times 127}{1000}$$

實驗十五 Sörensen 氏甲醛滴定

$$(A-B) \times 1.4 = 2 \text{ 毫升被檢液中氨基氮的毫克数}$$

式中： A =滴定被檢液消耗的 $0.1N$ 氢氧化鈉溶液平均毫升數^①；

B =滴定对照液消耗的 $0.1N$ 氢氧化鈉溶液毫升數；

$1.4=1$ 毫升 $0.1N$ 氢氧化鈉溶液相當的氮毫克數。

實驗十六 总氮量的測定

$$\frac{(A-B) \times 0.01N \times 14 \times 100}{C} = \text{血清含氮量(毫克\%)} \quad (1)$$

式中： A =滴定樣品用去的鹽酸平均毫升數；

B =滴定空白用去的鹽酸平均毫升數；

C =未稀釋的血清毫升數；

$0.01N$ =鹽酸的當量濃度；

14 =氮的原子量。

實驗二十八 維生素 C 定量測定

$$\frac{(A-B) \times C \times 0.088 \times 100}{D \times E} = 100 \text{ 克樣品中維生素 C 的毫克數} \quad (2)$$

式中： A =滴定被檢液所用去的 $2,6$ -二氯酚靛酚的平均毫升數；

B =滴定空白所用去的 $2,6$ -二氯酚靛酚毫升數；

C =被檢物提取液的總毫升數；

D =滴定所取的被檢液毫升數；

E =被檢樣品的重量。

1 毫升 $0.001 N$ $2,6$ -二氯酚靛酚溶液相當于 0.088 毫克

① 當被滴定的溶液的 pH 接近中性時，所消耗的氫氧化鈉毫升數為加入甲醛前後消耗的鹼的總數。如果是滴定酸或碱水解液，顯然，在加甲醛前中和溶液所用去的鹼或酸的數量均不應計算在內。在滴定酸溶液時，可先用碱中和到粉紅色，再用酸滴至顏色剛好消退，然後加甲醛再滴至桃紅色。計算時，只取加甲醛後用去的鹼量。

維生素 C

实验四十六 胃蛋白酶活性的测定

$$X = \frac{S_1}{S_2} \times a \times 16$$

式中： X = 清蛋白消化过程中产生的酪氨酸毫克数；

a = 0.3 毫升标准酪氨酸溶液中的酪氨酸毫克数；

S_1 = 消化样品滤液的光密度；

S_2 = 标准酪氨酸溶液的光密度。

样品总体积为 16 毫升，因此，在计算酪氨酸量的公式中乘以 16

实验五十 脂肪酸的氧化

$$X = \frac{(B - A) \times 0.9667 \times 10}{5}$$

式中： X = 样品中丙酮含量；

B = 滴定对照实验所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数；

A = 滴定样品所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数。

1 毫升 0.1 N 硫代硫酸钠相当于 0.9667 毫克丙酮。硫代硫酸钠的氧化还原当量等于它的分子量。

实验五十三 氨基酸的生酮作用

$$X = \frac{(B - A) \times 0.9667 \times 8}{5}$$

式中： X = 样品中丙酮的含量；

B = 滴定对照实验所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数；

A = 滴定样品所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数。

实验五十四 血清中钾的测定

$$X = [C - (B - A)] \times 0.142$$

式中： X = 样品中鉀的毫克数；

A = 滴定时所用之 $0.02N$ $KMnO_4$ 毫升数；

B = 所用 $0.02N$ $Na_2C_2O_4$ 之毫升数；

C = 最初加入 $0.02N$ $KMnO_4$ 毫升数。

实验五十五 血清中鈣的测定

$$X = (A - B) \times 0.2 \times 100$$

式中： X = 100 毫升血清中含鈣之毫克数；

A = 滴定样品所使用的 $0.01N$ $KMnO_4$ 毫升数；

B = 滴定空白所使用的 $0.01N$ $KMnO_4$ 毫升数。

实验五十六 血中无机磷的测定

$$\frac{\text{未知液讀數}}{\text{標準液讀數}} \times 0.02 \times \frac{100}{0.5} = 100 \text{ 毫升全血(血清)中磷的毫克數}$$

实验五十七 血中胆固醇测定

$$\frac{\text{未知液讀數}}{\text{標準液讀數}} \times 0.5 \times \frac{100}{0.5} = 100 \text{ 毫升全血含胆固醇的毫克數}$$

实验五十八 尿酸的测定

$$\frac{\text{未知液讀數}}{\text{標準液讀數}} \times 0.2 = 10 \text{ 毫升稀釋尿中尿酸毫克數}$$

实验五十九 尿素的测定

$$X = \frac{\text{未知液讀數}}{\text{標準液讀數}} \times 0.5 \times \frac{24 \text{ 小時尿總體積}}{0.05}$$

$$\text{尿素量(克)} = \text{尿素氮量}(X) \times 2.14$$

$$X = 24 \text{ 小時尿中尿素氮量(克)}$$

一些常用数据表

(1) 一些元素的原子量

元 素		原 子 量	元 素		原 子 量
氫	H	1.008	鋅	Zn	65.38
鋰	Li	6.94	砷	As	74.91
鎂	Be	9.01	硒	Se	78.96
硼	B	10.82	溴	Br	79.92
碳	C	12.011	鉻	Rb	85.48
氮	N	14.008	鈦	Sr	87.63
氧	O	16.000	鉬	Mo	95.95
氟	F	19.00	鈀	Pd	106.7
鈉	Na	22.99	銀	Ag	107.88
鎂	Mg	24.32	鍍	Cd	112.41
鋁	Al	26.98	錫	Sn	118.70
硅	Si	28.09	銻	Sb	121.76
磷	P	30.975	碲	Te	127.61
硫	S	32.066	碘	I	126.91
氯	Cl	35.457	銻	Cs	132.91
鉀	K	39.10	銻	Ba	137.36
鈣	Ca	40.08	鈮	W	183.86
鈦	Ti	47.90	鐵	Os	190.2
釩	V	50.95	鉑	Pt	195.23
鉻	Cr	52.01	金	Au	197.0
錳	Mn	54.94	汞	Hg	200.61
铁	Fe	55.85	鉛	Pb	207.21
钴	Co	58.94	銻	Bi	209.0
镍	Ni	58.71	鉨	Th	232.15
銅	Cu	63.54	鈾	U	238.07

(2) 市售濃酸和濃氨水的比重和濃度

名 称	比 重	百 分 濃 度	克 分 子 濃 度
盐 酸	1.19	7.2	12.0
盐 酸	1.18	35.4	11.3
硝 酸	1.425	71.0	16.0
硝 酸	1.4	65.6	14.5
硫 酸	1.84	95.3	18.0
氯 酸	1.15	70	11.6
磷 酸	1.69	85	14.7
醋 酸	1.05	99.5	17.4
醋 酸	1.075	80	14.3
氨 水	0.904	27	14.3
氨 水	0.91	25	13.4
氨 水	0.957	10	5.4

(3) 一些酸的解离常数

酸	解 离 常 数	酸	解 离 常 数
磷酸	1.1×10^{-1}	乳酸	1.55×10^{-4}
	1.95×10^{-1}	醋酸	1.86×10^{-5}
	3.6×10^{-1}	尿酸	1.5×10^{-6}
酸	3.8×10^{-1}	碳酸	3.04×10^{-7}
	4.9×10^{-1}		6×10^{-11}
水楊酸	1.06×10^{-1}	硼酸	6.6×10^{-10}
酒石酸	9.7×10^{-1}	酚	1.3×10^{-10}
	6.9×10^{-1}	柠檬酸	8×10^{-4}
馬尿酸	2.3×10^{-1}		2×10^{-5}
甲酸	2.05×10^{-1}		4×10^{-7}

(4) 指示剂

将强酸加到弱酸溶液中，后者的解离度减少。这很容易从公式 $[H^+][A^-] = K[HA]$ 中看出。如果 $[H^+]$ 增加，而 $[HA]$ 保持恒定，则为了保持平衡， $[A^-]$ 必须减少，即阴离子与氢离子结合成不解离的酸。若阴离子具有与分子不同的颜色，则此时可以



S0017398

观察到顏色的改变。这样的弱酸(或弱碱)能作为指示剂，按其顏色可确定溶液的氢离子濃度。

根据指示剂解离常數，在某一特定 pH 范圍內，它的顏色改变最明显。我們常用指示剂的 pH 范圍和顏色的改变如下：

名 称	pK _a	pH 范围	酸的顏色	碱的顏色
百里香藍	1.5	1.2—2.8	紅	黃
溴酚藍	4.0	4.0—4.6	黃	藍
溴甲酚綠	4.7	4.8—5.4	黃	藍
甲基紅	5.1	4.4—6.0	紅	黃
氯酚紅	6.0	4.8—6.4	黃	紅
溴百里香藍	7.0	6—7.6	黃	藍
酚紅	7.9	6—8.4	黃	紅
百里香藍(pK ₂)	8.9	8—9.6	黃	藍
酚酞	9.7	8—10.0	无色	粉紅
麝香草酚酞	—	9—10.5	无色	藍

(5)一些蛋白质的等电点

蛋 白 质	pI(等电点)	蛋 白 质	pI(等电点)
酪蛋白	4.62	小麦粒谷蛋白	7.1
血清清蛋白	4.64	玉米醇溶蛋白	6.2
血清球蛋白	4.8—6.4	麻仁球蛋白(大麻)	5.5
纖維蛋白原	5.4	卵清清蛋白	4.55—4.30
白明胶	4.7	魚精蛋白	12.0—12.4
血紅蛋白	6.74	胃蛋白酶	<1.0
氧合血紅蛋白	6.6		

58.173057
171(-2)

0 8093

杜惠春 78.4.22

杜惠春 83.4.13

58.173057
171(-2)

注 意

- 1 借書到期請即送還。
- 2 請勿在書上批改圈點，
折角。
- 3 借去圖書如有污損遺失
等情形須照價賠償。

草

博7-1

0 8093

统一书号 13010 · 523
定 价 ￥ 0.50